

**Université de Montréal**

**Identification des petits protéoglycanes riches en leucine  
comme nouveaux substrats de la MMP-13 dans le cartilage humain  
et caractérisation de leur site de clivage**

**Par**

**Jordi Monfort Faure**

**Département des Sciences Biomédicales, Université de Montréal  
Faculté de Médecine**

**Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures  
En vue de l'obtention du grade de Maître ès Science (M.Sc.)  
En Sciences Biomédicales**

**Août 2005**

**© Jordi Monfort Faure, 2005**



W

4

U58

2006

v.071

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

## RÉSUMÉ

L'arthrose (OA) est caractérisée par la dégradation des protéoglycanes et du collagène du cartilage. Les petits protéoglycanes riches en leucine (SLRPs) constituent une des familles de protéoglycanes. Les SLRPs sont caractérisés par leur association avec les fibrilles de collagène. La MMP-13 joue un rôle prépondérant dans l'arthrose. Cette enzyme coupe le collagène et dégrade certains protéoglycanes. Cependant, son effet sur les SLRPs a été peu étudié.

Nous avons étudié la capacité de la MMP-13 à couper certains SLRPs : la décorine, le biglycane, la fibromoduline et le lumican, dans le cartilage humain normal et OA à différents niveaux de sévérité de la maladie.

Nos résultats ont montré que la MMP-13 dégrade chacun des quatre SLRPs et que la fibromoduline et le biglycane en sont des substrats préférentiels. Le biglycane, la décorine et le lumican ont un profil de dégradation semblable dans le cartilage normal et OA. Cependant, la fibromoduline a un niveau plus élevé de dégradation dans le cartilage plus fibrillé. Le microséquençage a indiqué un lieu de coupure majeur (... VPK<sub>178-179</sub>VFS) pour le biglycane et un lieu potentiel de coupure pour la décorine. Ces derniers sont situés dans la région riche en leucine de chacune des molécules.

La dégradation des SLRPs par la MMP-13 représenterait un premier événement dans la dégradation des fibrilles en exposant le réseau de collagène. Ainsi, l'identification des produits de dégradation des SLRPs, particulièrement ceux du biglycane et de la fibromoduline, aiderait à une détection précoce de la dégénération du cartilage OA.

### Mots clés :

Arthrose	SLRPs
Cartilage	Fibromoduline
Protéoglycanes	Biglycane
Collagène	Décorine
MMP-13	Lumican

## SUMMARY

Osteoarthritis (OA) involves both proteoglycans and the collagen network of cartilage degradation. One of the proteoglycan families is the small leucine rich proteoglycans (SLRPs). SLRPs are characterized by their association with collagen fibrils.

MMP-13 was demonstrated to have a premier role in OA cartilage. This enzyme degrades native collagen and proteoglycans. Its effect on the SLRPs, however, has been scantily studied.

We therefore investigated the ability of recombinant human MMP-13 to cleave different SLRPs: decorin, biglycan, fibromodulin and lumican, in normal and OA human cartilage differing in the severity of the disease process.

The results show that MMP-13 is able to degrade all four SLRPs. Although only minimal cleavage of decorin and lumican were observed, cleavage of fibromodulin and biglycan was extensive, suggesting that these latter molecules are preferential substrates. In contrast to biglycan, decorin and lumican which yielded a degradation pattern similar for both normal and OA, fibromodulin had a higher level of degradation with increased cartilage damage. Microsequencing revealed a novel major cleavage site (...VPK<sub>178-179</sub>VFS) for biglycan and a potential cleavage site for decorin.

MMP-13-induced SLRP degradation may represent an initial event in collagen fibril degradation by exposing the collagen network. Identification of the SLRP degradation products, especially those of biglycan and fibromodulin, may assist in an early detection of degeneration in OA cartilage.

### Key words :

Osteoarthritis

Cartilage

Proteoglycans

Collagen

MMP-13

SLRPs

Fibromodulin

Biglycan

Decorin

Lumican

<b>IDENTIFICATION DU JURY .....</b>	<b>ii</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>iii</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>x</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>xi</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>I. L'arthrose .....</b>	<b>1</b>
a. Généralités.....	1
b. Physiopathologie .....	2
<b>II. Les tissus articulaires.....</b>	<b>4</b>
a. La membrane synoviale.....	4
1. Structure, composition et types cellulaires.....	4
2. La membrane synoviale et l'arthrose .....	5
b. L'os sous-chondral .....	6
1. Structure et physiologie de l'os normal.....	6
2. L'os sous-chondral et l'arthrose .....	7
c. Le cartilage.....	9
1. Structure du cartilage.....	10
2. Composition .....	11
a. Les chondrocytes.....	11
b. La matrice extra-cellulaire.....	12
i. La fraction liquide .....	14
ii. Les macro-molécules structurales .....	14
1. Le collagène .....	14
2. Les protéoglycanes.....	15
a. Structure des protéoglycanes.....	15
b. Les glycosaminoglycanes (GAG) .....	16
c. Classification des protéoglycanes .....	17

d. Fonctions des protéoglycanes.....	18
e. L'aggrécane .....	18
f. Le perlecane .....	20
g. Le syndécane .....	21
h. Les petits protéoglycanes riches en leucine (SLRPs).....	22
i. Les protéoglycanes et l'arthrose.....	22
III. Les petits protéoglycanes riches en leucine (SLRPs).....	23
a. La classe 1 : décorine et biglycane .....	24
1. Généralités.....	24
2. La classe 1 dans l'arthrose.....	27
b. La classe 2 .....	27
1. Généralités.....	27
2. La classe 2 dans l'arthrose.....	29
c. La classe 3 .....	29
1. Généralités.....	29
2. La classe 3 dans l'arthrose.....	30
d. La classe 4 : la chondroadhérine .....	30
1. Généralités.....	30
2. La classe 4 dans l'arthrose.....	31
IV. Dégradation de la matrice cartilagineuse .....	31
a. Les métalloprotéases matricielles (MMPs) .....	31
b. Les aggrécanasés .....	35
<b>OBJECTIFS.....</b>	<b>36</b>
<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>37</b>
<b>Degradation of Small Leucine-Rich Repeat Proteoglycans by MMP-13:</b>	
<b>Identification of a New Biglycan Cleavage Site .....</b>	<b>37</b>
ABSTRACT .....	38
INTRODUCTION.....	40
MATERIALS AND METHODS .....	42
RESULTS.....	46
DISCUSSION .....	49

CONCLUSION .....	54
FIGURE LEGENDS .....	57
FIGURES .....	59
REFERENCES.....	63
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>69</b>
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>75</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>78</b>
<b>DÉCLARATION DE L'ÉTUDIANT CONCERNANT L'ARTICLE .....</b>	<b>97</b>

**LISTE DES FIGURES**

Figure 1 : L'articulation normale et arthrosique. ....	3
Figure 2: la membrane synoviale normale et arthrosique .....	6
Figure 3: L'os sous-chondral et ses modifications au cours de l'arthrose .....	9
Figure 4: Structure du cartilage articulaire.....	9
Figure 5: Organisation de la matrice extra-cellulaire et interaction avec le chondrocyte .....	13
Figure 6: Le cartilage articulaire et ses modifications au cours de l'arthrose .....	13
Figure 7: Les différents types de collagène présents dans le cartilage articulaire .....	15
Figure 8: Structure globale des protéoglycanes .....	16
Figure 9: Structures des différents glycosaminoglycanes .....	17
Figure 10: Structure du perlecan .....	21
Figure 11: Structure globale des SLRPs.....	24
Figure 12: Structure de la décorine .....	25

**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1: Classification des MMPs et de leurs substrats préférentiels .....33

**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

<b>COX :</b>	cyclooxygénase
<b>EGF :</b>	Facteur de croissance épidermique
<b>FGF :</b>	Facteur de croissance des fibroblastes
<b>GAGs :</b>	glycosaminoglycanes
<b>IL-1 :</b>	Interleukine-1
<b>iNOS :</b>	Synthase inductible de l'oxyde nitreux
<b>KO :</b>	Knock out
<b>LDL :</b>	lipoprotéines de basse densité
<b>MMP:</b>	Métalloprotéases matricielles
<b>OA:</b>	Arthrose
<b>PLA<sub>2</sub> :</b>	phospholipase A <sub>2</sub>
<b>PG :</b>	Prostaglandines
<b>PRELP :</b>	Protéine riche en arginine qui se termine par une région riche en leucine
<b>SLRPs :</b>	Petits protéoglycanes riches en leucine
<b>TIMP :</b>	Inhibiteur tissulaire des métalloprotéases
<b>TGF :</b>	Facteur de croissance transformant
<b>TNF :</b>	Facteur de nécrose des tumeurs

## REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier les docteurs Johanne Martel-Pelletier et Jean-Pierre Pelletier pour m'avoir permis de travailler dans leur laboratoire et de m'offrir l'opportunité de travailler sur un projet d'une telle importance. Leur expérience à tous les deux, en tant que directrice et co-directeur de cette maîtrise, ainsi que dans le domaine de la recherche et de la gestion d'un laboratoire, sont un cadeau d'une valeur inestimable dont je garderai un souvenir précieux.

Je voudrais également remercier tout le personnel du laboratoire des Drs Martel-Pelletier et Pelletier : Dre Ginette Tardif, David Hum, Changshan Geng, Martin Boily et François-Cyril Jolicoeur pour m'avoir enseigné une grande partie des techniques utilisées dans ce travail.

Je tire ma révérence à François Mineau, avec qui j'ai eu un immense plaisir à travailler. Sa précision et son assurance dans tous les domaines du laboratoire, ainsi que sa capacité à répondre à mille questions à la fois, font de lui une personne aussi humaine qu'exceptionnelle.

Je remercie Dr Peter Roughley pour sa précieuse collaboration. Je tiens à mentionner l'importance de son expertise et de son esprit critique dans ce projet.

Je remercie profondément Dr Daniel Lajeunesse et Dr Hassan Fahmi pour leur amitié, ainsi que tout le personnel de leurs laboratoires, avec une mention spéciale pour Aline, Denis, Saranette et Katherine, qui ont guidé et soutenu mes premiers pas dans ce laboratoire et collaboré à la rédaction de cette maîtrise.

Il serait injuste d'oublier Santa, Esokia et Virginia, nos secrétaires, qui résolvent une grande partie des problèmes techniques journaliers avec précision et rapidité.

Je remercie l'Université de Montréal pour son appui financier durant ce projet.

Je tiens particulièrement à remercier tous mes collègues du service de rhumatologie de l'hôpital Del Mare de Barcelone qui ont rendu possible mon séjour à Montréal.

Finalement, je garde ces derniers mots pour remercier Alex Watson, Dre Christelle Boileau et Dr Pascal Reboul.

Alex Watson a été la première personne à m'enseigner l'art de manier une pipette, fabriquer un tampon ou faire un dosage. Mais par dessus tout, je le remercie pour son amitié inconditionnelle et son sourire constant.

Christelle Boileau possède l'esprit le plus vif ou organisé que je connaisse, ainsi que son humilité par rapport à son esprit scientifique. Ses conseils et son appui ont été inestimables durant la rédaction de cette maîtrise. Mais par dessus tout, Christelle connaît en profondeur la signification de l'amitié et son grand cœur ne connaît pas de limites.

Pascal Reboul représente pour moi ce qu'un scientifique se doit d'être. Grâce à lui, j'ai acquis la capacité d'analyser et de réfléchir face à un résultat. Il cache également un des cœurs les plus honnêtes et généreux que je connaisse. Je suis fier d'avoir travaillé avec lui et d'être son ami.

Grâce à lui et sa famille, je garde en mémoire les plus belles images de l'hiver québécois.

*À ma femme, Alba et à mes fils, Jordi et Francesc.*

*À mes parents, Jordi et Katy. À mon frère, Xavier.*

*À la douce mémoire de mes grands-parents, Antonio, Conxita, Joan et Catalina.*

*Tous ces derniers sont les seuls amours inconditionnels de ma vie.*

*À mes amis Martí Pons, Delfin Rotés et Josep Vergés.*

*Ceux-ci m'ont enseigné la valeur du mot amitié*

## INTRODUCTION

### I. L'arthrose

#### a. Généralités

L'arthrose est la maladie articulaire la plus fréquente. Sa forte prévalence, surtout chez les personnes âgées, et la fréquence des problèmes associés à l'arthrose font de cette maladie l'une des pathologies les plus invalidantes chez les personnes âgées notamment au niveau des tâches impliquant les articulations portantes (1).

L'arthrose peut se développer dans toutes les articulations synoviales du corps, mais les articulations les plus atteintes sont les mains, les genoux, les hanches et la colonne vertébrale. Une seule articulation peut être atteinte, mais la majorité des patients souffrent de plusieurs articulations. Cette pathologie est fortement liée à l'âge. Elle est rare chez les personnes de moins de 40 ans mais sa fréquence augmentant avec l'âge, la plupart des individus de plus de 60 ans ont des signes radiologiques d'arthrose dans certaines articulations (2).

D'après un rapport sur la prévalence des maladies articulaires, le nombre moyen de personnes souffrant d'arthrose aura augmenté de 57% en 2020 et les troubles fonctionnels occasionnés par cette pathologie augmenteront de 66% aux Etats-Unis. Ces estimations alarmantes sont attribuables à la large prévalence de la pathologie chez les personnes âgées et à l'augmentation de la moyenne d'âge de la population (3).

Les problèmes cliniques associés aux changements pathologiques et radiographiques impliquent la douleur articulaire à l'usage, la raideur articulaire consécutive à une période d'inactivité de courte durée, la douleur associée au mouvement de faible amplitude et le crépitement de l'articulation. La douleur est particulièrement importante, et l'arthrose est de ce fait considérée comme la cause la plus importante de douleur articulaire locale chez les personnes âgées (2). Qui plus est, l'atteinte des genoux et des hanches constituent une atteinte chronique avec un impact significatif sur la qualité de vie et le bien-être psycho-social des patients. Ainsi, il n'est pas

surprenant que l'arthrose soit une cause mondiale de handicap, particulièrement chez les personnes âgées (4).

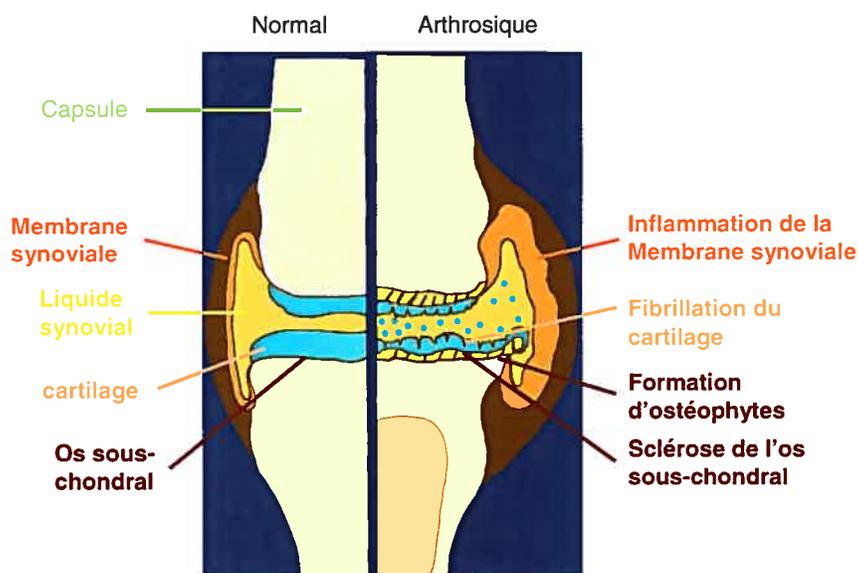
### b. Physiopathologie

L'arthrose est la plus commune des atteintes des articulations synoviales. Elle est caractérisée par des dommages articulaires localisés dans les zones portantes et associés avec la dégradation du cartilage, la néo-synthèse osseuse sur les bords de l'articulation (ostéophytes), des changements au niveau de l'os sous-chondral, différents degrés de synovites et l'épaississement de la capsule articulaire (Figure 1). Dans les états avancés de la maladie, les dommages sont visibles sur des radiographies, montrant le pincement de l'interligne articulaire causé par la perte de cartilage, les ostéophytes et même les modifications de l'os sous-chondral (2).

Des facteurs biochimiques et génétiques, ainsi que des facteurs mécaniques, interviennent dans le développement des lésions arthrosiques au niveau du cartilage articulaire. Les lésions altèrent les interactions chondrocytes/matrice et en modifient les réponses métaboliques du chondrocyte (5). Dans les phases précoces de la maladie, le chondrocyte a une réponse proliférative transitoire où est induit une augmentation de la synthèse de la matrice cartilagineuse reflétant une tentative de réparation. Il y a également une augmentation de la synthèse des cytokines cataboliques et des enzymes de dégradation. Les cytokines cataboliques peuvent être également synthétisées par des cellules de type fibroblaste ou macrophage dans la membrane synoviale en réponse à une stimulation par les produits de dégradation du cartilage. Dans le cartilage, la perte locale en protéoglycanes (aggrécanes) et la dégradation du collagène de type II interviennent dans un premier temps dans les zones superficielles, provoquant une augmentation de la rétention d'eau et une perte des forces tensiles de la matrice cartilagineuse. L'intervention des métalloprotéases matricielles (MMPs) dans la dégradation des collagènes et protéoglycanes du cartilage est bien établie. Les niveaux de leur inhibiteur tissulaire naturel (TIMP-1) sont également augmentés dans les tissus de l'articulation. La progression de la

dégradation de la matrice cartilagineuse dans l'arthrose est corrélée avec un déséquilibre local entre les niveaux des protéases et de leurs inhibiteurs (5;6).

L'arthrose a longtemps été considérée comme une pathologie non-inflammatoire. Cependant, de nombreuses données ont démontré le rôle des cytokines pro-inflammatoires produites par la membrane synoviale et les chondrocytes dans la dégradation du cartilage dans l'arthrose. L'interleukine (IL)-1 $\beta$  et probablement le facteur de nécrose des tumeurs (TNF)- $\alpha$  sont les causes principales impliquées dans les mécanismes inflammatoires reliés à l'arthrose. D'autres cytokines ont été retrouvées élevées mais leur rôle exact dans le cartilage reste à déterminer. Depuis des années, de nombreux travaux ont démontré que plusieurs facteurs inflammatoires, incluant la synthase inducible de l'oxyde nitreux (iNOS), la cyclooxygénase (COX)-2 et la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), étaient capables de moduler certaines fonctions cataboliques du chondrocyte dans l'arthrose (5) (7;8).



**Figure 1 : L'articulation normale et arthrosique. Disposition des tissus articulaires (membrane synoviale, os sous-chondral et cartilage) et leurs modifications au cours de l'arthrose**

## II. Les tissus articulaires

### a. La membrane synoviale

#### 1. Structure, composition et types cellulaires

La membrane synoviale est identifiée microscopiquement comme un tissu conjonctif composé de couches de 0,5 à 5 mm d'épaisseur. Elle recouvre l'intérieur de l'articulation, les tendons et les bourses (figure 1). La membrane synoviale n'est pas recouverte d'une membrane basale, même si certaines protéines de la membrane basale peuvent être associées à ses couches superficielles (9). Néanmoins, elle est composée de deux types de synoviocytes qui ont été identifiés comme des synoviocytes de type macrophage le type A, et de type fibroblastique, le type B, sur des bases morphologiques, sur l'expression des marqueurs de surface ainsi que sur l'expression et la fonction des protéines qu'ils expriment (9;10). Les synoviocytes de type A, que l'on nommera macrophages synoviaux, sont dérivés de monocytes de la moelle osseuse (11;12). Les synoviocytes de type B, que l'on nommera fibroblastes synoviaux par la suite, se développent à partir de cellules progénitrices mésenchymateuses à l'intérieur même du synovium (13).

Les synoviocytes ont des caractéristiques spécifiques hautement adaptées à leurs fonctions. Tout d'abord, la membrane synoviale a une architecture en deux couches, la couche bordante « lining » et la couche sous-jacente, qui peuvent être comparées à l'architecture d'un épithélium ou d'un endothélium. Ensuite, les synoviocytes ont la capacité de synthétiser non seulement de grandes quantités de hyaluronate, aussi appelé acide hyaluronique nécessaire au maintien de l'homéostasie du compartiment synovial, mais également d'importantes quantités d'enzymes de dégradation de la matrice dans des conditions inflammatoires (9).

Dans le synovium normal, la surface de la couche bordante est composée de fibroblastes synoviaux interdigitalisés et de macrophages synoviaux en plus faible quantité (9). Il a donc été suggéré que les fibroblastes synoviaux forment un réseau pour les macrophages synoviaux et pour toute l'architecture de la couche bordante.

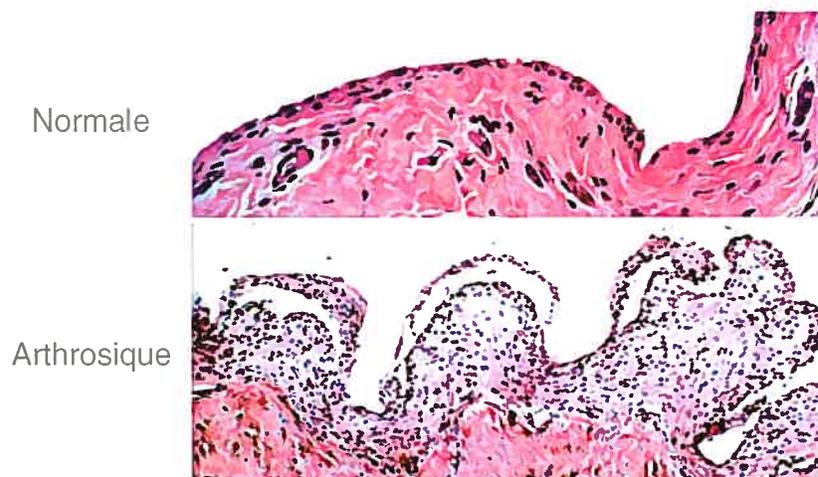
Cette hypothèse est supportée par la capacité des fibroblastes synoviaux à synthétiser les composants de la matrice synoviale, comme la fibronectine, la laminine, les collagènes de type I, III, IV et V, l'entactine, la chondroïtine et l'héparane sulfate. Ces molécules constituent une matrice identique à une membrane basale autour des fibroblastes synoviaux, même dans le cas où une membrane basale classique n'est pas associée aux cellules bordantes (9;14).

Cette architecture remplit les espaces entre les surfaces articulaires et facilite les mouvements de l'articulation. Le tissu sous-jacent contient des vaisseaux sanguins et lymphatiques, des fibres nerveuses et de nombreuses cellules de type macrophage, fibroblaste et adipocyte. (9)

## 2. La membrane synoviale et l'arthrose

La membrane synoviale est le siège de réactions clés intervenant dans la physiopathologie de l'OA. Ces réactions sont initiées et favorisées par la capture de débris de cartilage dénaturé par les cellules bordantes de la membrane synoviale. Celles-ci contribuent aux symptômes cliniques de l'arthrose tels que le gonflement, la douleur et la raideur articulaire (15;16). La synovite ou inflammation synoviale (**figure 2**) est elle-même caractérisée par une activation des cellules de la membrane synoviale et par un infiltrat de cellules inflammatoires (lymphocytes et monocytes) (17). Des effets pro- aussi bien qu'anti-inflammatoires des cytokines, des neuropeptides et des eicosanoïdes, ont été démontrés pour de nombreux médiateurs libérés par le tissu synovial inflammé dans l'arthrose (18).

Les eicosanoïdes libérés dans l'arthrose sont synthétisés par la COX. Deux isoformes, les COX-1 et -2, ont été identifiées comme des enzymes clés de la synthèse des prostaglandines (19). Ces enzymes sont exprimées dans la membrane synoviale (20). La COX-2 est l'isoforme exprimée de façon prédominante dans la membrane synoviale arthrosique. Son expression est augmentée d'abord dans les cellules bordantes puis dans les vaisseaux sanguins et dans les cellules sous-jacentes. La COX-1 est aussi exprimée dans les mêmes compartiments mais à un niveau plus faible.



**Figure 2: la membrane synoviale normale et arthrosique**

## b. L'os sous-chondral

### 1. Structure et physiologie de l'os normal

Le tissu osseux assure 3 fonctions différentes : il procure un support mécanique et est le site d'encrage des muscles; il assure la protection des organes vitaux et de la moelle osseuse; finalement, c'est un réservoir métabolique de calcium et de phosphate.

L'os est composé de cellules entourées d'une matrice extra-cellulaire (21;22). Les cellules sont de 3 types: les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes (23).

Les ostéoblastes sont responsables de la synthèse de la matrice extra-cellulaire ou tissu ostéoïde qui sera secondairement minéralisée (24). Certains ostéoblastes, lorsqu'ils sont complètement entourés par la matrice extra-cellulaire, sont appelés ostéocytes (25). Les ostéoblastes synthétisent principalement le collagène de type I qui forme des fibres de collagène. Ils libèrent également la plupart des autres

constituants de la matrice comme les protéoglycanes, les glycoprotéines, l'ostéonectine, l'ostéocalcine et les facteurs de croissance (26).

Les ostéocytes sont situés dans des logettes d'où partent des canalicules anastomosés qui contiennent leurs prolongements cytoplasmiques. Les ostéocytes sont capables de maintenir l'homéostasie de la matrice osseuse (25).

Les ostéoclastes sont des cellules de grande taille avec plusieurs noyaux. Ils sont responsables de la résorption osseuse (27).

La matrice extra-cellulaire est formée de collagène de type I à 90% et de protéines non-collagéniques. Les cristaux d'hydroxyapatite et les cristaux amorphes de phosphate de calcium forment le réseau minéral de la matrice lié aux fibres de collagène et à la substance fondamentale. Cette dernière est composée de glycoprotéines complexes et de protéoglycanes. Le rôle joué par les protéines non-collagéniques n'est pas encore entièrement connu. Cependant, leur présence est nécessaire au processus de minéralisation (28).

## **2. L'os sous-chondral et l'arthrose**

Dans le tissu articulaire normal, l'os sous-chondral est formé de larges trabécules avec de petits espaces trabéculaires. En revanche, dans les stades précoces de l'arthrose, la plaque osseuse est plus fine. Il y a une réduction de l'épaisseur des trabécules et les espaces trabéculaires sont plus grands. Dans les stades plus avancés de l'arthrose, l'os sous-chondral s'épaissit et les espaces trabéculaires augmentent (23). Dans les stades terminaux de la maladie, il y a un remodelage des tissus calcifiés de l'articulation et une sclérose de l'os sous-chondral (figure 3). Les altérations de l'os sous-chondral pourraient être soit une conséquence soit à l'origine de la dégradation du cartilage. Des études ont en effet rapportées que les modifications de l'os sous-chondral pouvaient précéder les lésions du cartilage (29), alors que d'autres ont montré que les modifications de l'os sous-chondral suivaient celles du cartilage. Quoiqu'il en soit, la progression de la destruction de l'articulation est associée à un remodelage intensif de l'os sous-chondral et à une augmentation de la dureté de l'os sous-chondral. La réparation des microfractures trabéculaires dans

l'os sous-chondral suite à une mise en charge brusque des articulations pourrait être à l'origine de l'augmentation de la rigidité de l'os qui, par conséquent, n'est plus efficace dans l'absorption des chocs. Ceci induit donc un stress au niveau du cartilage et ainsi des fibrillations de ce dernier tissu (30).

Par ailleurs, la rigidité de l'os sous-chondral pourrait faire partie de la dégénérescence globale de l'os et produire une augmentation apparente de la densité minérale osseuse ou du volume (23). En fait, différentes études ont montré que les patients ne souffrent que très rarement d'ostéoporose et d'arthrose simultanément (31), et que les patients arthrosiques ont une masse osseuse mieux préservée indépendamment de la masse corporelle (32). Qui plus est, l'utilisation de techniques d'histologie a montré que les os arthrosiques humains avaient une densité osseuse augmentée. Par contre, des techniques d'histomorphométrie ont montré que le volume osseux était augmenté mais que cet os, par unité de volume, était moins minéralisé que celui de sujets contrôlés d'âge identique ou plus jeunes (33). Par conséquent, la densité peut être diminuée dans un os où le volume est augmenté si la minéralisation par unité de tissu est diminuée (34).

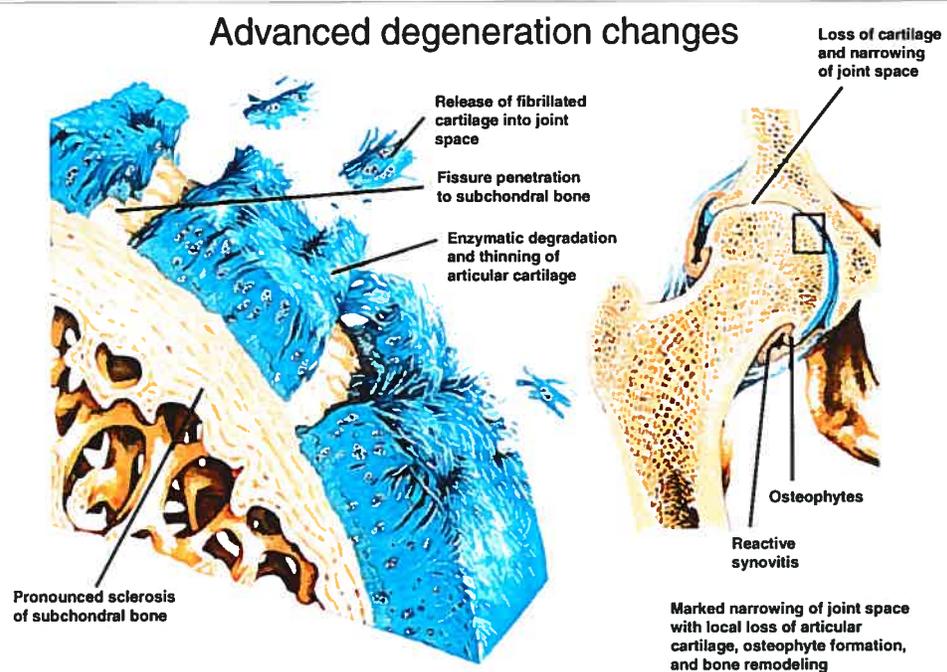


Figure 3: L'os sous-chondral et ses modifications au cours de l'arthrose (modifié d'un symposium clinique, 1996)

### c. Le cartilage

Le cartilage est un tissu conjonctif avasculaire et non innervé, composé de cellules, les chondrocytes, et d'une matrice extra-cellulaire ( **figure 4** ). Il existe 3 sortes de cartilage dans le corps humain : le cartilage hyalin, le fibrocartilage et le cartilage élastique (situé au niveau de l'épiglotte et du larynx). Le cartilage élastique est présent au niveau des disques intervertébraux et des ménisques alors que le cartilage hyalin, également appelé cartilage articulaire, couvre les épiphyses des articulations diarthrodiales (35).

Le cartilage articulaire est un tissu spécialisé dans la distribution de la charge avec un minimum de friction au niveau de la surface articulaire. Ses propriétés compressives et tensiles sont déterminées par la composition de la matrice et des fluides. Elles sont maintenues par les chondrocytes dans une articulation homéostatique (36).

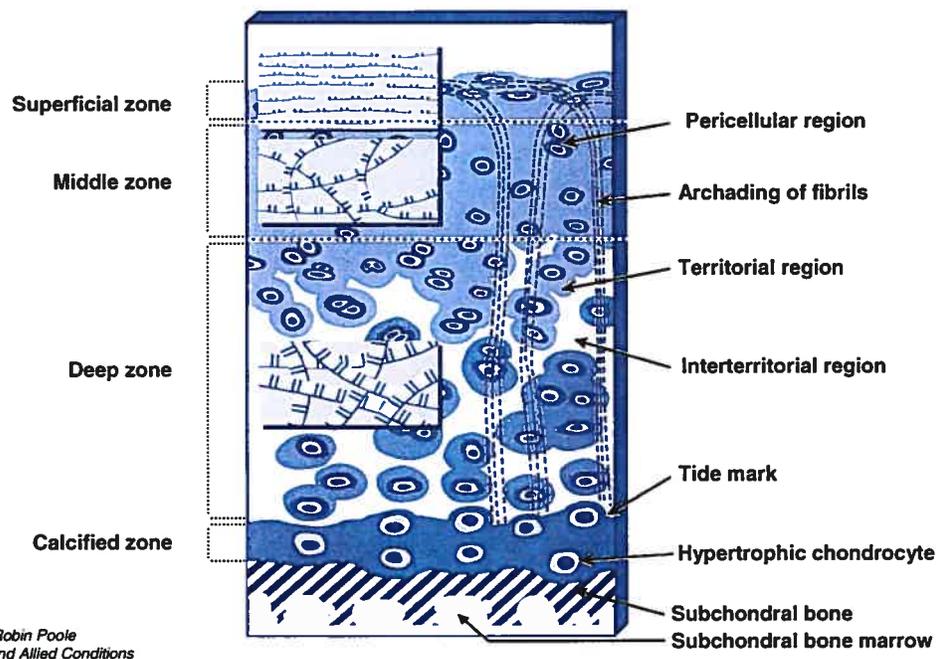


Figure 4: Structure du cartilage articulaire (tirée de Poole AR, Arthritis and Allied Conditions, 2005)

## 1. Structure du cartilage

La composition, l'organisation et les propriétés de la matrice extra-cellulaire ainsi que la morphologie, la taille et l'activité métabolique des cellules sont différentes entre la surface et la profondeur du cartilage (**Figure 4**). L'histomorphogénèse du cartilage articulaire est régulée pendant le développement squelettique par des forces intermittentes et les déplacements imposés par les articulations diarthrodiales. La formation de 4 zones est un élément clé dans le développement du cartilage : la couche superficielle (I), la couche intermédiaire ou de transition (II), la couche radiale ou profonde (III) et la couche de cartilage calcifiée (IV) (**Figure 4**) (37).

L'épaisseur totale du cartilage change d'une articulation à l'autre. La cellularité est inversement proportionnelle à l'épaisseur du cartilage et dépend de l'intensité des forces mécaniques appliquées (37). La cellularité dépend de l'intensité des forces mécaniques imposées dans certains secteurs (3)

Dans la couche superficielle (I) (**figure 4**), les chondrocytes sont de petite taille et aplatis. Ils sont disposés parallèlement à la surface articulaire. Les fibres de collagène sont fines et agencées parallèlement à la surface articulaire.

La zone intermédiaire (II) représente 40 à 60% de l'épaisseur totale du cartilage. Les chondrocytes sont plus gros, seuls ou en groupe et distribués au hasard. Les fibres de collagène suivent une disposition en arche dans la matrice.

Dans la zone radiale ou profonde (III), les chondrocytes ont une forme d'ellipse. Ils sont disposés en colonnes de 2 à 6 cellules, orientées perpendiculairement à la surface articulaire. Les fibres de collagène sont orientées dans le même sens que les colonnes de chondrocytes.

Enfin, dans la zone calcifiée (IV), les chondrocytes sont moins nombreux et épars. La zone profonde est séparée de la zone calcifiée par un front de calcification appelé « tidemark »(35;38).

Dans les zones superficielles du cartilage, le collagène est orienté horizontalement. Les fibres sont plus compactes et leur diamètre moins important. Cette orientation

protège contre les érosions du cartilage tant qu'elle permet la transmission des forces de compression de la surface du cartilage vers ses extrémités. Le contenu en collagène diminue progressivement depuis la surface vers les profondeurs du cartilage. Dans les couches profondes, les fibres sont plus séparées, leur diamètre est plus important et elles sont alignées verticalement. Les fibres de collagène se prolongent par des fibres dans le cartilage calcifié mais pas avec celles de l'os sous-chondral (3).

## 2. Composition

Les chondrocytes sont les seuls éléments cellulaires du cartilage. Ils représentent 2 à 3% du volume total du cartilage, alors que la matrice constitue 97 à 98% du volume total. La matrice extra-cellulaire est composée d'eau pour 70 à 80% et de matière sèche pour 20%. Le collagène de type II représente 50% de cette matière sèche et les protéoglycanes 30 à 35%. Les derniers 15 à 20% correspondent aux autres protéines extra-cellulaires (3).

### *a. Les chondrocytes*

Les chondrocytes sont peu nombreux dans le cartilage et leur nombre tend à diminuer avec l'âge. Les chondrocytes sont des cellules hautement spécialisées dans la biosynthèse et la maintenance des constituants de la matrice extra-cellulaire (**figure 5**). Les chondrocytes sont aussi responsables d'un système de protéolyse complexe capable d'effectuer des renouvellements périodiques des différents éléments constitutifs de la matrice extra-cellulaire. Ils leur est possible de maintenir dans le cartilage adulte normal un équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme (39). Les chondrocytes ont un petit nombre de mitochondries. Ceci est dû à leur consommation réduite d'oxygène. Les cellules de la couche profonde, mais non celles du cartilage calcifié, ont un réticulum endoplasmique et un appareil de Golgi développés et tous deux adaptés à la synthèse des protéines et à la sulfatation des mucopolysaccharides (40;41).

Les chondrocytes varient en taille, forme et nombre par unité de volume de tissu entre la surface et la profondeur du cartilage. L'unité fonctionnelle du cartilage est le chondron. Il est formé par le chondrocyte, l'espace qu'il occupe dans la matrice cartilagineuse et la matrice péricellulaire formée de glycoprotéines synthétisées par la cellule. Il existe une capsule de collagène adjacente au chondron qui confère des propriétés mécaniques à la structure et régule le passage des molécules et des ions de la cellule vers la matrice et vice versa (42).

En dépit de la relative quiescence du chondrocyte mature, la cellule est capable de répondre aux stimuli biochimiques, structuraux ou physiques, de synthétiser des enzymes, des facteurs de croissance, des cytokines ainsi que les différents constituants de la matrice extra-cellulaire. Les chondrocytes sont capables de maintenir une activité anabolique élevée dans le cartilage de croissance. Cependant, la capacité à combler la perte de collagène est limitée dans le cartilage mature. Seule la synthèse de protéoglycanes semble être maintenue. La division cellulaire est un phénomène rare, mais il est possible de l'observer dans le cartilage adulte en réponse à certaines agressions (43;44).

#### ***b. La matrice extra-cellulaire***

La matrice extra-cellulaire est constituée par une fraction liquide et un cadre solide de macromolécules (**figure 5**) qui confèrent au cartilage ses caractéristiques biochimiques spéciales. La matrice extra-cellulaire varie aussi en fonction des éléments cellulaires sur toute l'épaisseur du cartilage de manière à différencier 3 zones dans le cartilage articulaire adulte : la région péricellulaire, riche en protéoglycanes, en protéines non-collagéniques et en collagène non fibrillaire, la matrice territoriale qui forme un réseau telle une capsule autour du chondron, et la matrice inter-territoriale, de volume plus important, formée de fibres de collagène de gros diamètre formant des arches ancrés dans les profondeurs et dirigés vers la surface.

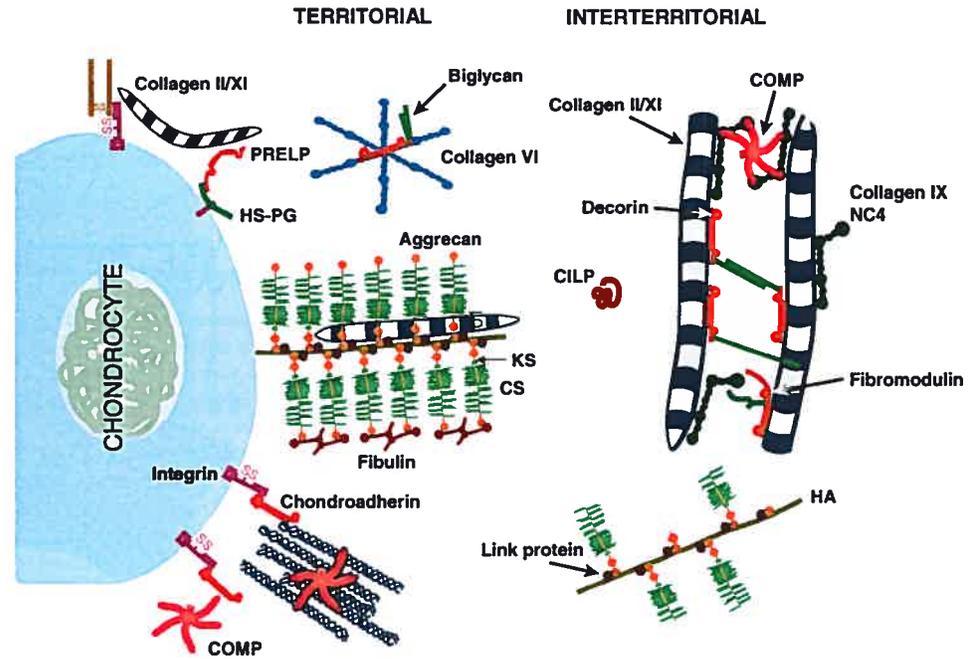


Figure 5: Organisation de la matrice extra-cellulaire et interaction avec le chondrocyte (tirée de Heinegard, Bayliss and Lorenzo, Osteoarthritis, 2<sup>ème</sup> édition, 2003)

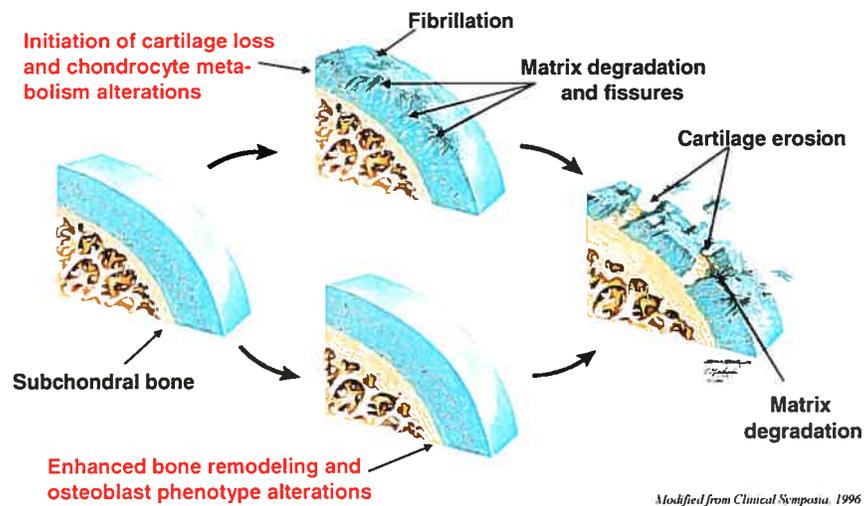


Figure 6: Le cartilage articulaire et ses modifications au cours de l'arthrose (modifié d'un symposium clinique, 1996)

### i. La fraction liquide

L'eau constitue près de 70% du poids du cartilage et ses interactions avec les macromolécules matricielles influencent les propriétés mécaniques du tissu. L'eau contenue dans la matrice cartilagineuse est distribuée de manière inégale. Sa concentration est plus élevée en surface et elle diminue graduellement vers la profondeur (45). La forte densité de charges négatives produites par les protéoglycanes attire et retient les molécules d'eau dans la matrice extra-cellulaire. Si ces molécules ne sont pas capables de retenir le liquide dans la matrice extra-cellulaire et de prévenir leur perte par la matrice, le cartilage perd son élasticité, sa flexibilité et sa capacité à réduire les frictions et distribuer les pressions (**figure 6**). Le contenu tissulaire en eau joue un rôle important dans le maintien de l'élasticité, permettant la nutrition et la lubrification du système (46).

### ii. Les macro-molécules structurales

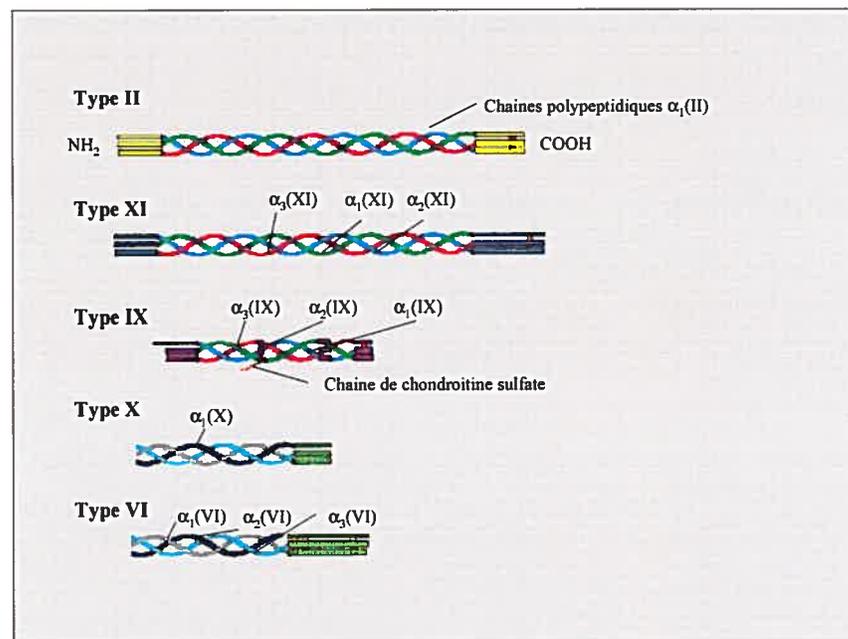
La matrice extra-cellulaire est formée d'un réseau de fibres de collagène dans lequel un autre réseau de protéoglycanes s'insère, en plus des petites glycoprotéines et des protéines non-collagéniques.

#### 1. Le collagène

L'élément structural principal du cartilage est le réseau de collagène, formé principalement par les fibres de collagène de type II et dans une moindre mesure par les collagènes de type VI, IX, XI, XII et XIV.

Le collagène de type II a une demi-vie extrêmement longue, environ 100 ans, comparée à la demi-vie de l'aggrécane, qui est d'environ 5 ans (47;48). Ceci est propre au cartilage mais il est possible de le trouver également dans le corps vitreux et la chorde. Il est formé de 3 chaînes alpha-1 ( $\alpha 1$ ). Le collagène de type II est synthétisé par le chondrocyte et relargué sous la forme de pro-collagène. Il subit ensuite un clivage protéolytique qui supprime la zone non hélicale. Il est incorporé plus tard dans la matrice où il est organisé en un réseau tri-dimensionnel afin de parer aux forces de traction et de résister aux forces de tension. Les collagènes de type VI, IX, XI, XII et XIV (**figure 7**) sont minoritaires dans le cartilage mais jouent

cependant un rôle structural et fonctionnel très important. Les données actuelles montrent que le collagène de type XI pourrait jouer un rôle dans la détermination de l'épaisseur des fibres de collagène de type II (49;50). Ceci est important dans le développement et pour l'intégrité du cartilage. En effet, des mutations génétiques de cette molécule provoquent des anomalies de développement et sont la cause d'histoires familiales d'arthrose (51).



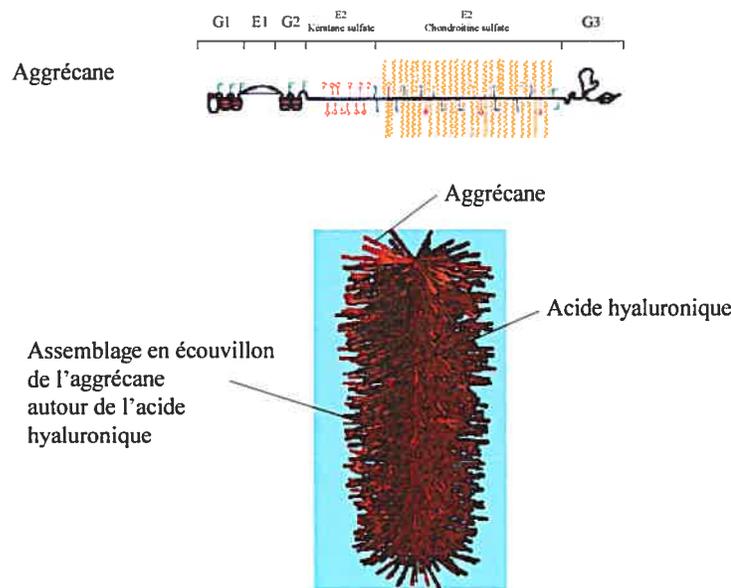
**Figure 7: Les différents types de collagène présents dans le cartilage artériel**

## 2. Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont des macromolécules synthétisées par les chondrocytes. Dans un état physiologique, les chondrocytes maintiennent constante la quantité de protéoglycanes dans la matrice extra-cellulaire avec un taux de renouvellement important. (52)

### a. Structure des protéoglycanes

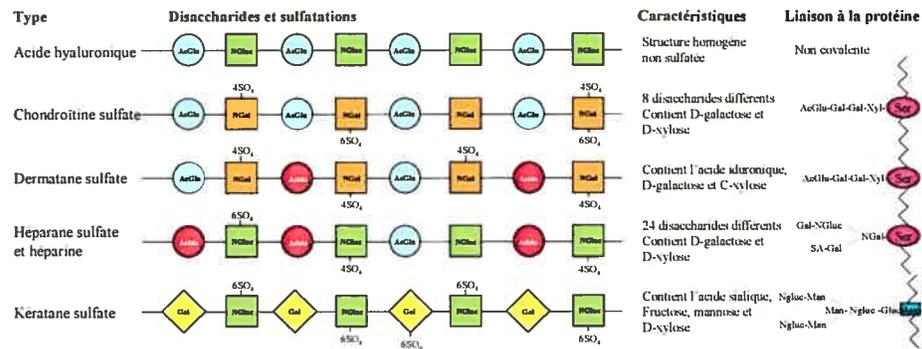
Les protéoglycane sont formés d'un axe central de nature protéique auquel les glycosaminoglycane (GAGs) sont liés de façon covalente (53) (**figure 8**). Les protéoglycane sont des molécules très hydrophiles qui s'insèrent dans le réseau de collagène (52).



**Figure 8: Structure globale des protéoglycane**

### *b. Les glycosaminoglycane (GAG)*

Les GAGs sont des chaînes polyanioniques de longueur variable, générées par la répétition d'un disaccharide où l'un des résidus est toujours une hexosamine (D-glucosamine ou D-galactosamine) et l'autre est un acide hexuronique (acide D-glucuronique ou acide L-iduronique) (54). En fonction de la nature des disaccharides présents, on obtient différents types de GAGs (**figure 9**): acide hyaluronique, chondroïtine sulfate, dermatane sulfate, héparane sulfate ou kératine sulfate. Par exemple, l'acide hyaluronique est un glycosaminoglycane linéaire formé par la répétition du disaccharide acide glucuronique-N-acétylglucosamine. Il est le seul à ne pas être sulfaté et ne se lie pas de façon covalente aux protéines (55).



**Figure 9: Structures des différents glycosaminoglycane (AcGlu=acide glucuronique; AcIdo=acide iduronique; NGal=N-acétylgalactosamine; NGLuc=N-acétylglucosamine; Gal=Galactose; Ser=sérine)**

### c. Classification des protéoglycane

Il existe différentes classifications des protéoglycane. Historiquement, ils étaient classés en fonction de la chaîne de GAG prédominante. Cependant, il est difficile d'établir des groupes à cause de l'hétérogénéité des GAGs, de l'existence des protéoglycane hybrides, et de l'absence de caractéristiques spécifiques aux noyaux protéiques. Une autre classification peut être établie en se basant sur la séquence d'acides aminés, la réactivité immunologique et les propriétés topographiques et fonctionnelles des protéoglycane (56). On peut alors distinguer les familles suivantes : 1) les protéoglycane extra-cellulaires de grande taille capable d'interagir avec l'acide hyaluronique ou la chaîne de chondroïtine sulfate est prédominante, représentés par l'aggrecane; 2) les petits protéoglycane avec des noyaux protéiques homologues substitués par une ou deux chaînes de GAGs (chondroïtine sulfate, dermatane sulfate ou kératine sulfate), représentés par les petits protéoglycane

riches en leucine (SLRPs); 3) les protéoglycanes de la membrane basale qui contiennent des chaînes d'héparane sulfate, représentés par le perlecan; 4) les protéoglycanes des membranes cellulaires, normalement de type hybride, représentés par le syndécan; 5) les protéoglycanes intra-cellulaires contenant un noyau protéique dont la séquence est constituée d'une alternance de sérine et de glycine avec des chaînes de chondroïtine sulfate et d'héparane sulfate.

#### *d. Fonctions des protéoglycanes*

Les protéoglycanes assurent des fonctions variées, allant d'un rôle de support à une fonction dans les processus cellulaires tels que l'adhésion, la motilité, la prolifération, la différenciation ou la morphogenèse (57-59). La plupart de ces fonctions dépendent de la chaîne de GAGs et de leur capacité à interagir avec les autres protéines. Cette association peut se faire par une interaction de faible affinité grâce à des charges ioniques opposées ou par une interaction hautement spécifique. Certaines fonctions sont assurées par la chaîne de GAGs libres, telles que l'activité anticoagulante et antiproliférative de l'héparine (60). Dans la plupart des cas, l'activité est dépendante du noyau protéique. Le noyau protéique peut constituer une base pour l'immobilisation et l'espacement adéquats des chaînes de GAGs. L'ancrage du noyau protéique à la surface cellulaire peut être essentiel pour lui permettre d'adopter la position correcte pour l'interaction des GAGs avec les ligands. Dans certains cas, les noyaux protéiques contiennent des régions spécifiques sans protéoglycanes. Ces régions peuvent interagir spécifiquement avec des autres macromolécules de la matrice (53).

#### *e. L'aggrécane*

L'aggrécane est le principal protéoglycane du cartilage hyalin. Il représente 80% des protéoglycanes totaux de ce tissu (61). Le rapport structure-fonction de cette molécule est l'un des plus étudiés. Sa fonction est de répartir les charges mécaniques, fonction cruciale dans une articulation portante. Dans le cartilage, les protéoglycanes et l'aggrécane en particulier, jouent un rôle essentiel pour assurer les

propriétés mécaniques du tissu. Les agrégats d'aggrécane sont insérés dans la matrice extra-cellulaire du cartilage comme un gel hydraté piégé dans un réseau insoluble de collagène. La capacité de l'aggrécane à interagir avec l'eau est une conséquence de sa charge négative. Son activité osmotique génère une pression de gonflement contenu par les forces tensiles du réseau de collagène. Quand le cartilage est comprimé, l'eau sort, concentrant les aggrécanes et augmente leur activité osmotique. A la fin de la compression, l'eau regagne les aggrécanes qui retrouvent leur état de gel (61;62).

L'aggrécane (**figure 8**) a un noyau protéique avec un domaine pluri-globulaire. Dans certaines régions spécifiques de la chaîne polypeptidique, il lie 120 chaînes de chondroïtine sulfate, 80 de kératane sulfate et un nombre variable d'oligosaccharides. Son contenu en polysaccharides est très élevé et représente 90 à 95% du poids de la molécule (61;62).

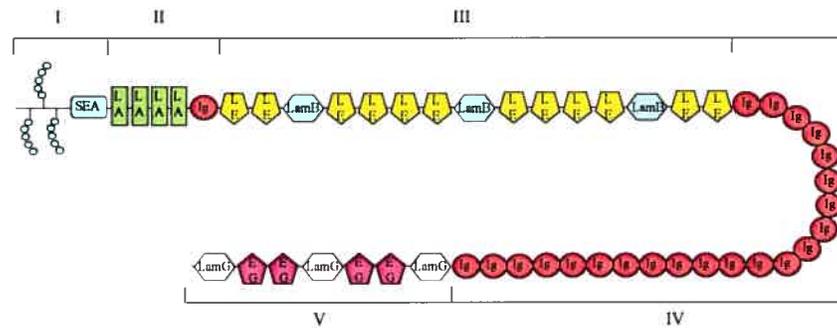
Les domaines globulaires G1, G2 et G3 (**figure 8**) contiennent des motifs structuraux retrouvés dans d'autres protéines. En effet, à l'extrémité N-terminale de la molécule, les domaines globulaires G1 et G2 présentent des homologies structurales avec des immunoglobulines. Ceci suggère un rôle dans les processus de reconnaissance, d'adhésion cellulaire et de réponse immunitaire (63;64). Le domaine G3 est composé de deux à trois motifs structuraux appartenant à différentes familles de protéines. Il possède une région homologue aux protéines régulatrices du complément et une autre région ayant des caractéristiques communes avec des lectines du groupe C. Une troisième région a des homologies avec le facteur de croissance épidermique (EGF) et est exprimée de façon variable (61;65). Les caractéristiques de ce domaine G3 font de cette molécule un membre de la famille des sélectines, molécules impliquées dans la reconnaissance cellule-cellule dans les processus d'extravasation et d'inflammation.

Comme son nom le suggère, l'aggrécane forme de gros agrégats moléculaires constitués de nombreux monomères reliés de façon non covalente à l'acide hyaluronique (**figure 8**). Cette interaction est hautement spécifique et implique

l'union du domaine G1 de l'aggrécane avec 5 disaccharides de l'acide hyaluronique (61;62). Cependant l'union n'est stable qu'avec la participation d'une petite glycoprotéine, appelée protéine d'union. Celle-ci interagit autant avec l'acide hyaluronique qu'avec le domaine G1 (66).

#### *f. Le perlecane*

Le perlecane est un protéoglycane présent dans tous les tissus vascularisés. Il est généralement distribué au niveau de la membrane basale dans les régions péricellulaires. Cette sous-famille comprend des glycoprotéines avec une structure en multi-domaines qui lie des chaînes d'héparane sulfate (67;68). Cet héparane sulfate se lie dans le domaine I dans une région contenant 3 séquences sérine-glycine-aspartate consécutives (**figure 10**). Le domaine II est homologue à la région d'union du ligand des récepteurs de lipoprotéines de basse densité (LDL). Parmi les fonctions du perlecane, même si elle reste spéculative, son rôle dans le métabolisme des LDL est intéressant. Le perlecane est fortement exprimé dans les cellules sinusoidales du foie, dans la rate et dans les cellules sub-endothéliales vasculaires. Il semble donc logique de penser que les LDL vont entrer en contact avec le perlecane pendant son transport. Les domaines III, IV et V présentent des homologies avec la superfamille des immunoglobulines. Les fonctions de ces régions sont hypothétiques mais par analogie avec d'autres protéines les contenant, elles pourraient être impliquées dans les interactions protéine-protéine, dans la dimérisation des molécules de perlecane dans la membrane basale, dans la stabilisation de la matrice extracellulaire et dans l'amélioration de l'adhésion cellulaire (69). Cette protéine joue un rôle clé grâce à sa chaîne d'héparane sulfate dans le stockage et la libération de facteurs de croissance des fibroblastes (FGF) (70).



**Figure 10: Structure du perlecan (SEA=sperm protein, enterokinase and agrin; LA=récepteur des LDL de classe A; LE=laminine-1 EGF- similaire; LamB=module globulaire similaire à celui du bras court de la chaîne  $\alpha 1$  de la laminine 1; Ig=répétition de type immunoglobuline; LamG=domaine G du bras long de la chaîne  $\alpha 1$  de la laminine 1; EG=Domaine de type EGF) (adapté de Iozzo, 1998)**

### *g. Le syndécan*

Les protéoglycane associés à la surface cellulaire sont présents dans toutes les cellules où ils assurent des fonctions diverses (71;72). Ils participent à la régulation de la coagulation sanguine (thrombomoduline), assurent un rôle de récepteur (récepteur de la transférine et CD44) et interagissent avec d'autres constituants de la matrice extracellulaire ou des facteurs de croissance.

Les 4 membres de la sous-famille de syndécan sont caractérisés par un petit domaine cytoplasmique correspondant à l'extrémité C-terminale de la molécule, un domaine transmembranaire et un grand domaine extracellulaire. Les principales caractéristiques de ces molécules sont la conservation des sites de liaison des GAGs et oligosaccharides, le maintien d'un site de clivage protéolytique dans un site

adjacent au domaine transmembranaire et un degré élevé d'homologies dans le domaine transmembranaire (73;74).

Les différents changements de chaîne de chondroïtine et héparane sulfate présentes dans le syndécane sont le reflet de la variété de ligands qui peuvent s'y lier. Parmi eux, on trouve les composants de la matrice extracellulaire et le FGF (75;76). La liaison du syndécane aux constituants de la matrice extracellulaire donne des informations sur son environnement à la cellule. De cette façon, le syndécane est considéré comme un récepteur ayant la capacité de participer à la transduction des signaux intracellulaires.

#### *h. Les petits protéoglycanes riches en leucine (SLRPs)*

Le groupe de protéoglycanes et de glycoprotéines qui contiennent des domaines riches en leucine est nommé aussi protéoglycanes en fer à cheval (horseshoe) (77). Ils sont formés d'un peptide signal, d'un propeptide contrôlant la substitution de GAGs, d'une région riche en cystéine pouvant être sulfatée par la tyrosine ou substituée par des GAGs et d'une région importante riche en leucine. Ils sont terminés par une région riche en cystéine. Le motif riche en leucine est LXXLXLXXNXL/I., où L correspond à leucine, I à isoleucine et N à asparagine (77). Ce motif n'est pas uniquement présent dans les protéines matricielles. On le retrouve également dans les protéines intracellulaires. Il intervient dans les interactions protéine-protéine.

Les caractéristiques des différents SLRPs seront détaillées à la section III.

#### *i. Les protéoglycanes et l'arthrose*

La composition en protéoglycanes est modifiée au cours de la vie et varie selon la localisation dans le cartilage. Par exemple, la proportion de chondroïtine 4-sulfate est plus élevée chez l'enfant alors que le kératane sulfate est prédominant chez la personne âgée et dans les couches profondes du cartilage.

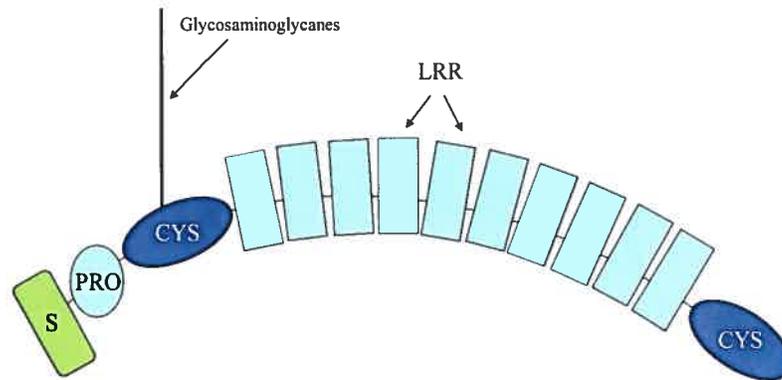
Chez l'humain, on observe avec l'âge un raccourcissement des chaînes de chondroïtine sulfate, une augmentation de la proportion de chondroïtine 6-sulfate et une augmentation des noyaux protéiques (78). On observe également une augmentation du domaine G1 et une accumulation de la protéine d'union (77). Ceci implique un processus de dégradation qui favorise le développement de l'arthrose où la perte nette de protéoglycane est associée à un changement macroscopique dégénératif (**figure 6**).

### **III. Les petits protéoglycanes riches en leucine (SLRPs)**

Les SLRPs sont des petits protéoglycanes formant une famille caractérisée par des chaînes polypeptidiques riches en leucine (**figure 11**). Ils ne représentent que 1 à 2% de la masse totale de protéoglycanes du cartilage. Dans les tissus fibreux, ils sont présents au niveau de 95% des protéoglycanes totaux (79).

Le domaine riche en leucine est connu pour intervenir dans l'adhésion cellulaire, la migration cellulaire, la transduction du signal, la réparation de l'ADN et la synthèse des ARN messagers. Les SLRPs sont particulièrement impliqués dans la régulation de l'assemblage de la matrice, la maintenance et la croissance de différents tissus comme la cornée, les os, les dents, le cartilage, la peau, les tendons et les vaisseaux sanguins (80).

Le domaine riche en leucine des SLRPs expose à sa surface une structure en feuillet  $\beta$ , structure classiquement connue pour participer aux interactions protéine-protéine (3)



**Figure 11: Structure globale des SLRPs (S=peptide signal de la région N-terminale; PRO=propeptide; CYS=région riche en cystéine; LRR=région riche en leucine) (tirée de Woods A, Arthritis and Allied Conditions, 2005)**

La famille de SLRPs peut se subdiviser en 4 classes: La classe 1 inclut la décorine, le biglycane et l'asporine; la classe 2 inclut la fibromoduline, le lumican, le kératocan, l'ostéoadhérine et la PRELP (protéine riche en arginine qui se termine par une région riche en leucine); la classe 3 comprend l'épiphycan, l'ostéoglycine ou mimecan et l'opticine; la classe 4 correspond à la chondroadhérine et la nyctalopine (3).

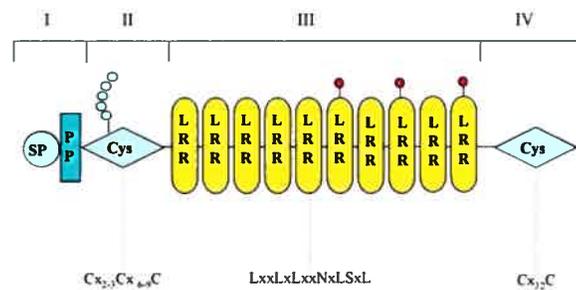
#### a. La classe 1 : décorine et biglycane

### 1. Généralités

La décorine a été la première des SLRPs identifiés. La décorine (**figure 12**) et le biglycane présentent de très grandes homologies. Ils contiennent 12 répétitions consécutives de 24 acides aminés, avec de nombreuses leucines. La décorine doit son nom au fait qu'elle coiffe le collagène de type I et II. L'interaction avec le collagène

s'établit par l'intermédiaire du noyau protéique sans intervention des chaînes de GAGs (81). Lorsque la décorine se lie à la surface de la fibre de collagène, l'assemblage latéral de la triple hélice est bloqué, déterminant le diamètre final de la fibre (82;83). Même si le noyau protéique est relié à la fibre de collagène, les chaînes de GAGs sont importantes pour maintenir la distance inter-fibrillaire.(83).

La décorine et le biglycan sont retrouvés dans le cartilage fœtal en développement et dans le cartilage mature. L'aggrécane, la décorine et le biglycane sont contenus dans des proportions similaires dans le cartilage humain adulte. La décorine et le biglycane sont plus concentrés à la surface du cartilage et dans les zones péricellulaires (84).



**Figure 12: Structure de la décorine (SP=peptide signal; PP=propeptide; Cys=région riche en cystéine; LRR=région riche en leucine) (adapté de Iozzo 1998). Point rouge : Asparagine liée aux oligosaccharides. Chaîne bleu : Dermatan-/ chondroïtine-sulfate**

La liaison du noyau protéique de la décorine avec le collagène de type I limite le diamètre des fibres. Il a été montré dans un modèle de souris déficientes (knockout = KO) pour la décorine, que l'assemblage des fibres est désorganisé et que les propriétés tensiles de la peau sont réduites (85). Ceci met en évidence le rôle de la

décorine dans l'organisation des fibrilles et dans les propriétés tensiles. La décorine se lie aussi au collagène de type XIV.

La forme en fer à cheval de la décorine et la dimension de son arche permettent d'envisager un modèle d'interaction avec la triple hélice de collagène (80).

Même si la décorine coiffe le collagène de type II, aucune modification du diamètre des fibres n'a été observée dans les souris KO (80).

La structure tridimensionnelle de la décorine a été publiée récemment (161). Dans cet article les auteurs proposent une structure dimérique pour la protéine. Chaque monomère est formée par un seul domaine replié sous forme de solénoïde (right-handed). Chaque domaine contient 12 LRR (I-XII) flanqués par une structure en épingle dans la région N-terminale et une chaîne bêta à la fin du domaine LRR-XII. Les auteurs proposent une conformation plus ouverte que la structure typique sous forme de fer à cheval. Ceci donnerait à la molécule la possibilité de s'unir à plus d'une molécule de collagène. La surface concave est impliquée dans la dimérisation de la décorine et ne permettrait pas l'union à son ligand. Toutefois d'autres auteurs ont démontré que la décorine en solution est active uniquement sous forme de monomère. Cette structure permettrait d'expliquer l'union de la molécule à différents ligands (163).

L'organisation tissulaire et l'interaction potentielle du biglycane avec les différents composants de la matrice extracellulaire cartilagineuse sont moins clairement définies. Le biglycane porte deux chaînes de chondroïtine ou dermatane sulfate. Les souris n'exprimant pas le biglycane ont un niveau de décorine normal mais montrent un retard de croissance post-natal. Ceci met en évidence le rôle du biglycane dans la régulation positive de la formation de la masse osseuse (80).

Cependant, il n'existe pas de preuve de défaut dans les fibres de collagène de type II dans le modèle de souris KO pour le biglycane.

La décorine, le biglycane et la fibromoduline sont capables de lier le collagène de type II. Cependant, le biglycane peut également lier le collagène de type VI (86).

La décorine et le biglycane ont la capacité de lier le facteur de croissance transformant (TGF $\beta$ ) vraisemblablement par les domaines riches en leucine de la

protéine. Ceci conduit à l'inactivation du facteur de croissance. Cette interaction constitue une compétition entre la décorine et le récepteur du TGF $\beta$  (87).

Il est possible pour le noyau protéique de la décorine d'interagir avec la fibronectine et le thrombospondine afin d'inhiber l'adhésion des fibroblastes avec ces substrats (88-90).

## **2. La classe 1 dans l'arthrose**

Il a été montré que les différences de contenu en décorine et biglycane entre le cartilage normal et arthrosique se situaient au niveau des couches profondes du cartilage (84). En fait, le cartilage arthrosique contiendrait autant de SLRPs de classe I que le cartilage normal, mais ceux-ci seraient concentrés dans les couches profondes du cartilage. Par ailleurs, une étude ultrastructurale a pu mettre en évidence une augmentation de synthèse de décorine et de biglycane dans les stades avancés d'arthrose. Ceci représenterait une dernière tentative de réparation par le cartilage (91).

### **b. La classe 2**

#### **1. Généralités**

La fibromoduline a été initialement isolée du cartilage articulaire. Cependant, elle est présente dans la plupart des tissus. Elle se lie au collagène sur un site différent de celui de la décorine. Elle peut être l'un des facteurs régulant la formation des fibres de collagène de type I et II dans ce tissu (92;93). La liaison de la fibromoduline au collagène peut réguler les interactions avec d'autres composants de la matrice. Des études de microscopie électronique montrent qu'elle joue un rôle important dans les fibrilles matures, particulièrement dans la formation du réseau, en optimisant les propriétés tensiles du tissu. La fibromoduline porte 4 chaînes de kératane sulfate (94). Son expression augmente avec l'âge dans le cartilage humain.

Comme la fibromoduline, le lumican contient des chaînes de kératane sulfate. Le lumican est le principal protéoglycan de type kératane sulfate dans la cornée. Il

est largement distribué dans les tissus de l'organisme. Il est présent dans le cartilage où il est associé aux fibres de collagène tout comme au niveau de la cornée. Son expression est augmentée dans le cartilage adulte (95). Il a été proposé que le lumican pourrait réguler l'assemblage des fibres de collagène, car en son absence, le diamètre des fibres est trop important dans certains tissus (96;97).

Le keratocan est exprimé en quasi totalité dans le tissu de mammifères adultes dans la cornée et la sclérotique (98). Le noyau protéique du keratocan pourrait se lier aux fibres de collagène afin d'en réguler le diamètre. Ses chaînes de GAGs régulent la taille des espaces interfibrillaires. Ces hypothèses sont supportées par le fait que l'absence de keratocan provoque des modifications dans les espacements des fibrilles et par conséquent dans le diamètre des fibres dans le stroma cornéal des souris KO pour le keratocan (97). Cependant, l'absence de keratocan provoque des anomalies moins préjudiciables que l'absence de lumican. En effet, l'absence de lumican dans les souris KO pour ce gène est à l'origine de l'opacité de la cornée et de la fragilité cutanée. De plus, une étude dans la cornée a montré que le keratocan pourrait être régulé par le lumican (99). On ne dispose que de peu d'information sur le keratocan dans le cartilage articulaire. Sa présence a été montrée dans le cartilage articulaire bovin (98).

L'ostéoadhérine est exprimée par les ostéoblastes matures. Elle a été identifiée comme un protéoglycane riche en résidus leucine et aspartate dans la matrice minéralisée de l'os. C'est une protéine acide qui se lie à l'hydroxyapatite (100). Elle peut également se lier aux ostéoblastes via l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . Son expression a été montrée dans d'autres tissus comme les tendons, la moelle osseuse et dans l'interface entre l'os et le cartilage au niveau de la tête fémorale (100).

La PRELP a une séquence similaire à celles de la fibromoduline et du lumican. Elle a aussi 4 sites potentiels de N-glycosylation. Elle contient un domaine riche en arginine et proline, spécifiquement dessiné pour lier l'héparine et/ou l'héparane sulfate (101). Ceci pourrait influencer les réactions et les interactions à la surface des cellules où l'héparane sulfate est présent comme chaîne latérale des protéoglycanes de la surface cellulaire. Elle assure un rôle dans l'organisation de la matrice. Elle pourrait également moduler les effets du FGF. Le FGF agirait sur le

métabolisme des chondrocytes (3). Son activité dépend des chaînes héparine et héparane sulfate pour son activité. Le domaine riche en leucine de la PRELP lie fortement le collagène, comme tous les membres de sa classe (102). Elle peut également établir des liaisons entre les collagènes dans la matrice extracellulaire et les protéoglycanes contenant de l'héparane sulfate à la surface des cellules (102).

## **2. La classe 2 dans l'arthrose**

La fibromoduline joue un rôle dans l'arthrose. En effet, il a été montré dans un modèle de souris KO pour la fibromoduline, que le diamètre des fibres de collagène de type I était anormalement mince dans le tendon et autres tissus fibreux et que ces animaux avaient une tendance prononcée à développer de l'arthrite avec l'âge (103;104). Ceci serait dû à la mauvaise qualité des ligaments. D'autre part, dans un modèle de double KO fibromoduline et lumican, les ligaments confèrent une hyperlaxité articulaire favorisant le développement de l'arthrose (105).

Il a été montré que le lumican contenait des chaînes de kératane sulfate dans le cartilage jeune et que le kératane sulfate pouvait être substitué dans les chondrocytes après un traitement à l'IL-1 (106).

En ce qui concerne le keratocan et l'ostéoadhérine, leur expression a été montrée respectivement dans le cartilage bovin et murin (100;107). Mais il n'existe aucune évidence de leur présence dans le cartilage humain ni de leur implication dans l'arthrose.

L'expression de la PRELP a été montrée dans le cartilage humain. Cependant son rôle dans l'arthrose n'a pas été décrit (108).

### **c. La classe 3**

#### **1. Généralités**

L'épiphycan est un dermatane sulfate. Il a été différencié de la décorine et du biglycane dans le cartilage épiphysaire ce qui a déterminé son nom (53). Tout comme la décorine et le biglycane il possède deux résidus sérine qui constituent la

séquence consensus typique d'attachement des GAGs. Il est exprimé au cours du développement après l'aggrécane. Il est libéré par les précurseurs des chondrocytes articulaires et hypertrophiques. Il a d'ailleurs été suggéré que l'épiphycan pourrait jouer un rôle dans l'organisation de la matrice de la plaque de croissance, notamment dans la zone des chondrocytes aplatis, où il est abondant (80). L'épiphycan contient uniquement 7 répétitions de la séquence riche en leucine au lieu des 10 ou 11 normalement rencontrées dans ce type de molécules (109).

L'ostéoglycine a été initialement isolée comme un facteur inducteur dans la matrice osseuse bovine (110). Cette molécule de 12 kDa pourrait en fait être un fragment généré par un clivage protéolytique d'une plus grande protéine qui n'a cependant pas été identifiée. Son expression a été montrée dans la sclérotique, la cornée et les kératocytes en culture. Par contre, elle n'est présente qu'en faible quantité dans l'os et le cartilage (110-113).

L'opticine a été isolée du corps vitreux chez le bovin, où elle était reliée aux fibres de collagène. Elle a été originellement nommée oculoglycane et caractérisée dans la rétine (114;115) et l'iris humaine (116). Elle a également été trouvée dans les ligaments et la peau. Jusqu'ici, sa présence n'a pas été montrée dans les tissus articulaires humains. Par contre, elle a été mise en évidence chez le chien dans le cartilage de l'épaule et dans les chondrocytes des côtes (115). Elle contient 6 répétitions de la séquence riche en leucine.

## **2. La classe 3 dans l'arthrose**

Aucune information n'est publiée sur l'intervention des membres de la classe 3 des SLRPs dans l'arthrose.

### **d. La classe 4 : la chondroadhérine**

#### **1. Généralités**

La chondroadhérine a été initialement isolée du cartilage trachéal bovin. Elle contient 11 répétitions de la séquence riche en leucine (117). Il lui est possible de

fournir des signaux de rétro contrôle à la cellule par son interaction avec les récepteurs de l'intégrine  $\alpha_2\beta_1$  exprimés à la surface des chondrocytes (118). Elle pourrait être impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire. Elle est exprimée dans la région profonde de la plaque de croissance entre la zone de prolifération et la zone hypertrophique. On la trouve également dans les couches profondes du cartilage articulaire (119). Elle peut lier le collagène de type II sur 2 sites différents (117;120). Ce rôle n'est pas clairement défini, mais elle pourrait jouer un rôle dans l'organisation des grands agrégats dans les fibres proches de la surface cellulaire. Son expression a été trouvée dans le cartilage, les tendons, l'os, la moelle osseuse et les yeux dans des conditions physiologiques normales (120). Son expression est régulée par l'ostéoglycine/mimécan (121).

## 2. La classe 4 dans l'arthrose

Tout comme pour les molécules de la classe 3, aucune information n'est disponible sur la chondroadhérine dans l'arthrose.

### IV. Dégradation de la matrice cartilagineuse

L'arthrose se caractérise par la destruction du cartilage articulaire. Ceci est dû à la dégradation de la matrice. Cette dernière, en plus de l'usure mécanique, fait l'objet d'une digestion enzymatique. Les enzymes responsables de cette digestion sont synthétisées par les chondrocytes. Les enzymes sont de différents types : les métalloprotéases (MMP), les agrécanases (ADAMTS -4 et -5) et d'autres protéines appartenant aux familles des sérine- et des thiol-protéases.

#### a. Les métalloprotéases matricielles (MMPs)

Les MMPs correspondent à une famille de zinc endopeptidases (**tableau 1**). Les enzymes de cette famille ont des homologies structurales et fonctionnelles. Elles sont synthétisées sous une forme latente, et elles sont inhibées par des agents chélateurs et des inhibiteurs endogènes tissulaires spécifiques (TIMPs). Les MMPs

sont capables de dégrader plusieurs composants de la matrice extra-cellulaire, dont la triple hélice de collagène, les protéoglycanes, la fibronectine et la laminine (6;122). Actuellement, 25 types différents de MMPs ont été identifiés. Les membres de cette famille se répartissent en 5 sous-groupes (6): 1) les collagénases (MMP-1, -8 et -13); 2) les gélatinases (MMP-2 et -9); 3) les stromélysines (MMP-3, -10 et -11); 4) un groupe hétérogène qui rassemble la matrilysine (MMP-7), l'énamélysine (MMP-20) et la métalloélastase des macrophages (MMP-12 et -19); 5) les MMPs membranaires (MMP-14, -15, -16, -17, -24, -25 et MTI-6-MMP). Les groupes 1 et 2 correspondent aux MMPs classiques (6;123). Leur rôle dans la physiopathologie de l'arthrose est clairement défini.

Plusieurs MMPs (MMP-1, -2, -3, -8, -9, -13 et -14) peuvent digérer le collagène de type II de la matrice cartilagineuse. Malgré le fait que la MMP-1 soit importante dans la dégradation du cartilage arthrosique, aujourd'hui la MMP-13 est reconnue pour être la collagénase de l'initiation de la collagénolyse (124). La MMP-13, également appelée collagénase-3, est une MMP capable de dégrader rapidement plusieurs composantes de la matrice extracellulaire, et son importance dans l'arthrose humaine a été clairement établie et étudiée (124). Elle constitue d'ailleurs l'une des principales cibles potentielles thérapeutiques pour le traitement de l'arthrose, soit par la recherche d'inhibiteurs spécifiques de son activité, soit par une inhibition de sa synthèse (125).

MMP number	Enzyme	Preferred Substrate
<b>Collagenases</b>		
MMP-1	Interstitial collagenase	Collagen I, II, III, V, VII, VIII, X, Aggrecan, Gelatin, Serpins, proMMP-2, proMMP-9,
MMP-8	Neutrophil collagenase	Collagen I, II, III, V
MMP-13	Collagenase-3	Collagen I, II, III, IV, V, IX, X, XI, Gelatin, Aggrecan, LN, FN, Tenascin
MMP-18	Collagenase-4 ( <i>Xenopus</i> )	Helical collagen
<b>Gelatinases</b>		
MMP-2	Gelatinase A (72 kDa)	Collagen I, IV, V, VII, X, Gelatin, Elastin, FN, LN, Nidogen, activeMMP-9, activeMMP-13
MMP-9	Gelatinase B (92 kDa)	Collagen IV, Gelatin, Aggrecan, LN, Nidogen
<b>Stromelysins</b>		
MMP-3	Stromelysin-1	Collagen II, IV, IX, X, XI, LN, FN, Nidogen, Aggrecan, Proteoglycan, Elastin, Gelatin, proMMP-1, proMMP-7, proMMP-8, proMMP-9,
MMP-10	Stromelysin-2	Collagen IV, LN, FN, Nidogen, Proteoglycan, Gelatin
MMP-11	Stromelysin-3	LN, $\alpha$ 1-antitrypsin, $\alpha$ 1-proteinase inhibitor
<b>Membrane-type MMPs</b>		
MMP-14	MT1-MMP	Collagen I, II, III, Gelatin, LN, FN, VN, Nidogen, Aggrecan, Proteoglycan, Perlecan, Tenascin, proMMP-2, proMMP-13
MMP-15	MT2-MMP	Collagen I, II, III, Gelatin, LN, FN, VN, Nidogen, Aggrecan, Perlecan, Tenascin, proMMP-2, proMMP-13
MMP-16	MT3-MMP	Collagen I, III, Gelatin, Casein, LN, FN, VN, Aggrecan, Perlecan, proMMP-2, proMMP-13
MMP-17	MT4-MMP	FN, Fibrin, Gelatin
MMP-24	MT5-MMP	proMMP-2, proMMP-13
MMP-25	MT6-MMP	proMMP-2
<b>Others</b>		
MMP-7	Matrilysin	Collagen IV, Gelatin, Elastin, Proteoglycan, Glycoprotein
MMP-12	Metalloelastase	Elastin
MMP-19	(Unnamed)	Not known (Gelatin)
MMP-20	Enamelysin	Ameiogenin, Aggrecan, COMP

**Tableau 1: Classification des MMPs et de leurs substrats préférentiels**

La MMP-13 a été découverte en 1994 dans des cellules cancéreuses du sein (126) et par la suite, a été mise en évidence dans le cartilage humain et son importance a été montrée dans l'OA (124). La MMP-13 est une métalloprotéase matricielle sécrétée sous forme latente (60 kDa, 471 acides aminés). Elle est composée de domaines distincts : un pré-domaine contenant une séquence signal hydrophobe nécessaire à la sécrétion de l'enzyme, un pro-domaine impliqué dans la latence de l'enzyme et clivé de façon à activer l'enzyme, et ainsi qu'un domaine catalytique dans lequel se trouve le site de liaison au zinc. Le dernier domaine se situe dans la partie C-terminale ; ce domaine 'hemopexin-like' est essentiel à l'activité collagénolytique (126) et est impliqué dans l'activation de l'enzyme (127). Un mécanisme cellulaire responsable de l'activation in vivo de la MMP-13 a été proposé (128): une enzyme, la MT1-MMP (*membrane type-1 matrix metalloprotease*) ou MMP-14 effectuerait un premier clivage pour éliminer les 36 premiers acides aminés de la pro-forme, suivi d'un second clivage de 23 autres acides aminés par la gélatinase 72 kDa (MMP-2) afin de couper complètement le pro-domaine et produire la forme active finale de 48 kDa. Knauper et

al (127) ont montré récemment que l'activation cellulaire par la MT1-MMP dépendrait de la présence du domaine C-terminal. In vitro, la MMP-13 peut également être activée par différents facteurs dont le plus utilisé est l'acétate d'aminophényl de mercure (APMA). En plus de dégrader le collagène de types I, II et III, la MMP-13 est aussi active sur d'autres éléments de la matrice extracellulaire et, selon les conditions expérimentales, elle cliverait l'aggrécane, la fibronectine, la fibrilline, la gélatine et les collagènes en plus des types I, II ou III, ceux de types IV, IX, X et XIV (124;129-133).

Contrairement aux autres MMPs, cette enzyme a un profil de distribution très limité dans les tissus humains normaux. Elle est exprimée principalement lors de l'ossification fœtale et dans certains tissus en remodelage (134;135). Chez l'adulte sain, on la retrouve presque exclusivement au niveau du cartilage (124;129). Fait intéressant, l'expression de la MMP-13 est restreinte vis-à-vis de la pathologie et elle est plus élevée dans certains tissus malades. La production de la MMP-13 est augmentée dans le cartilage lors de l'OA et de polyarthrite rhumatoïde (124;129;136;137). Certains tissus cancéreux expriment aussi la MMP-13. Ces derniers sont : cancer du sein (126), chondrosarcome (138), carcinome du larynx (139), carcinome du cou et de la tête (140), tumeurs de l'épithélium (141) et carcinome de la vulve (142).

Contrairement aux gènes des autres MMPs qui sont transcrits en un seul ARN messager (ARNm), le gène de la MMP-13 est transcrit en deux ARNm principaux de 2.5 et 3.0 kb. Un transcrit mineur d'environ 2.2/ 2.0 kb est aussi parfois détecté (124). Ce dernier est retrouvé en quantité très faible et seulement lors d'une forte stimulation du niveau d'ARN. L'équipe de Freije et al (126) a suggéré que ces ARNm résultaient de l'utilisation d'un site différent de polyadénylation, ce que nos travaux récents ont confirmé. Cependant, le rôle de chacun de ces transcrits n'a jamais été étudié. La présence de différentes isoformes de cette enzyme a récemment été publiée dans le cartilage humain (143). et le rôle de ces isoformes est présentement à l'étude (Information personnelle Dre Martel-Pelletier). À noter, cette diversité dans le nombre de transcrits de la MMP-13 ne se rencontre que chez l'humain. En effet, on ne retrouve qu'un seul transcrit chez plusieurs espèces animales adultes tels le chien, le cheval, le

lapin et les rongeurs (144-146). Le gène de la MMP-13 humaine semble donc se démarquer au point de vue régulation génique des autres membres de la famille des MMPs.

De nombreux facteurs sont susceptibles de moduler l'expression de la MMP-13 humaine. La transcription du gène est induite par des cytokines pro-inflammatoires, des esters de phorbol et certains facteurs de croissance, tandis que d'autres agents tels l'IL-13, les glucocorticoïdes et l'acide rétinoïque ont un effet inhibiteur.

Enfin, la MMP-13 est capable de dégrader l'aggrécane (133) et la fibromoduline (147). D'autres SLRPs peuvent cependant être dégradés par d'autres MMPs. Il a été rapporté que la décorine est clivée par les MMP-2, -3 et -7 (148). L'effet d'autres MMPs sur ces substrats n'a pas été étudié.

#### b. Les aggrécanasés

Les aggrécanasés correspondent aux ADAMTS-1, -4 et -5. L'ADAMTS-4 est encore appelée aggrécanasé-1 et l'ADAMTS-5, l'aggrécanasé-2. Elles ont une activité MMP couplée à une activité aggrécanasé qui assure la dégradation de l'aggrécane. Cette activité et son rôle dans la dégradation du cartilage ne sont admis que depuis quelques années (149-151). Leur activité aggrécanasé est sensible à l'IL-1 $\beta$ , au TNF $\alpha$  et à l'acide rétinoïque. La dégradation de l'aggrécane par ces enzymes est due à leur activité glutamyl-endopeptidase.

Les aggrécanasés sont présentes aussi bien dans le cartilage normal que dans le cartilage arthrosique.

## OBJECTIFS

La dégradation des protéoglycanes est un événement majeur et précoce de la dégradation du cartilage dans l'arthrose. La MMP-13 joue un rôle clé dans la dégradation de la matrice extra-cellulaire du cartilage dans cette pathologie. Cette MMP, en plus de digérer le collagène de type II, est capable d'agir sur différents protéoglycanes. Les SLRPs constituent une famille de protéoglycanes. Ses membres sont capables de lier les fibres de collagène et d'intervenir dans leur organisation structurale.

Le but de cette étude est de documenter la dégradation des SLRPs de classe 1 (le biglycane et la décorine) et 2 (la fibromoduline et le lumican) par la MMP-13 et d'identifier les éventuels sites de coupure. Ces 4 molécules possèdent plus de 35% d'homologie au niveau de leurs acides aminés et un nombre important de structures conservées dans leurs protéines. Puisqu'il a été montré que certaines de ces molécules pouvaient être digérées par des MMPs dans certaines conditions, comme la décorine par les MMP-2, -3 et -7, et la fibromoduline par la MMP-13, on peut alors supposer que ces molécules peuvent être coupées par la MMP-13 même si tous ne possèdent pas le même site de coupure que la fibromoduline.

## RÉSULTATS

### **Degradation of Small Leucine-Rich Repeat Proteoglycans by MMP-13: Identification of a New Biglycan Cleavage Site**

Jordi Monfort<sup>1</sup>, Ginette Tardif<sup>1</sup>, Pascal Reboul<sup>1</sup>, François Mineau<sup>1</sup>, Peter Roughley<sup>2</sup>,  
Jean-Pierre Pelletier<sup>1</sup>, Johanne Martel-Pelletier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Osteoarthritis Research Unit, University of Montreal Hospital Centre, Notre-Dame  
Hospital, Montreal, Quebec, Canada, <sup>2</sup>Genetics Unit, Shriners' Hospital for Children,  
Montreal, Quebec, Canada.

Direct correspondence and reprint requests to: Johanne Martel-Pelletier, PhD,  
Professor of Medicine, Director Osteoarthritis Research Unit, University of Montreal  
Hospital Centre, Notre-Dame Hospital, 1560 Sherbrooke St. East, Montreal, Quebec,  
Canada H2L 4M1. Tel: 514-890-8000, x. 26658. Fax: 514-412-7582. Email:

████████████████████

**ABSTRACT**

A major and early feature of cartilage degeneration is proteoglycan breakdown. MMP-13 plays an important role in osteoarthritic (OA) cartilage degradation. This MMP, in addition to initiating collagen fiber cleavage, also acts on several proteoglycans. Among the proteoglycan families, one termed the small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) was found to be involved in collagen fibril formation/interaction, with some members demonstrating a role in the OA process. We investigated the ability of MMP-13 to cleave members of two classes of SLRPs: 1) biglycan and decorin and 2) fibromodulin and lumican.

SLRPs were isolated from human normal and OA cartilage using guanidinium chloride (4M) extraction. Digestion products were examined by Western blotting. The identity of the MMP-13 degradation products of biglycan and decorin (using specific substrate) were determined following electrophoresis and microsequencing.

We showed that the SLRPs studied were cleaved to differing extents by human MMP-13. Although only minimal cleavage of decorin and lumican was observed, cleavage of fibromodulin and biglycan was extensive, suggesting that both molecules are preferential substrates. In contrast to biglycan, decorin and lumican, which yielded a degradation pattern similar for both normal and OA, fibromodulin had a higher level of degradation with increased cartilage damage. Microsequencing revealed a novel major cleavage site (...VPK178-VFS) for biglycan and a potential cleavage site for decorin upon exposure to MMP-13.

We showed, for the first time, the ability of MMP-13 to degrade members from two classes of the SLRP family, and the site at which biglycan is cleaved by MMP-13.

The MMP-13-induced SLRP degradation may represent an early critical event, which may in turn affect the collagen network by the exposure of the MMP-13 cleavage site in this macromolecule. Awareness of the SLRP degradation products, especially those of biglycan and fibromodulin, may assist in an early detection of OA cartilage degradation.

## INTRODUCTION

Osteoarthritis (OA) is the most common rheumatologic disease, with high incidence and morbidity. Even though the early pathophysiological process remains to be determined, one of the first alterations in OA cartilage is a decrease in its proteoglycan content [1]. Proteoglycans form a large group that can be classified into five families according to the structural properties of their core protein [2, 3]. One group, termed the small leucine-rich proteoglycans (SLRPs), possesses a central domain of characteristic repeats that participate in protein-protein interactions [4]. The SLRPs can be divided into four classes based on gene organization and amino acid sequence homologies [1]. Members in class I are decorin, biglycan and asporin; in class II, fibromodulin, lumican, keratocan, PRELP (proline arginine-rich end leucine-rich repeat protein) and osteoadherin; in class III, epiphycan, mimecan and opticin; and in class IV, chondroadherin and the recently identified nyctalopin [5].

Although an understanding of the functions of SLRPs is only now emerging, most of the members bind specifically to other extracellular matrix constituents and contribute to the structural framework of connective tissues [4]. Moreover, some were shown to interact with various collagen types, including collagen type II, and to influence collagen fibril formation and interaction. These include decorin [6], fibromodulin [7], asporin [8], lumican [9], PRELP [10] and chondroadherin [11]. Moreover, fibromodulin, asporin [5], biglycan [12], decorin [12] and lumican [13] were also suggested to play a role in the OA cartilage process.

Decorin was the first in this series of molecules to be structurally defined. It contains one glycosaminoglycan chain, often dermatan sulfate, which can adopt complex secondary structures and form specific interactions with matrix molecules [4]. The decorin level in cartilage is by far the most abundant of the SLRPs, and in humans its level increases with increasing age [14]. Its proposed major functions are the regulation of collagen fibrillogenesis and maintenance of tissue integrity by its binding with fibronectin and thrombospondin [2, 15, 16]. The closely related family member biglycan, despite its 57% of homology with decorin [17], does not interact with collagen under all conditions. Biglycan interactions appear to be primarily with type VI collagen. Biglycan has been identified at the surface of cartilage and in the pericellular region. In OA cartilage, a higher concentration was reported in the deeper layers of the tissue [18]. Fibromodulin contains up to four keratan sulfate chains [6], and was originally described as a collagen-binding protein. It is able to influence collagen fibril formation and maintain a sustained interaction with the formed fibrils [19]. Lumican, which is present at a high level in the cornea [20], has a widespread distribution in connective tissues [15], including cartilage [21]. Lumican and fibromodulin have been shown to bind to the same site on the collagen fibril [19, 22]. Lumican modulates collagen fibrillogenesis and enhances collagen fibril stability [23].

Synthesis of collagen in normal and pathological cartilage is slow. However, in OA, the integrity of the collagen network is impaired. This could result from defective linking of the collagen fibrils by molecules such as the SLRPs, thus interfering with the network stability, preventing its repair and accelerating its degradation. Cleavage

of the SLRPs may then precede major destruction of the collagen and contribute to this process [19]. Data in the literature shows that members of the matrix metalloprotease (MMP) family are able to cleave some SLRPs. MMP-1 is able to cleave human recombinant lumican [24], MMP-2, MMP-3 and MMP-7 cleave human recombinant decorin [2], and MMP-13 cleaves bovine fibromodulin when this molecule is bound to collagen [19]. Purified bovine fibromodulin cannot be cleaved by human MMP-13 [19].

Although various MMPs are present in human OA cartilage, MMP-13 was demonstrated to have a major role. This enzyme, in addition to cleaving native collagen and having a higher activity on type II collagen than MMP-1, also acts to degrade various extracellular macromolecules including proteoglycans [25]. Limited studies, however, have been done on its effect on the SLRPs. We therefore investigated the ability of human recombinant MMP-13 to cleave members of two classes of the SLRPs (class I decorin and biglycan, and class II fibromodulin and lumican), derived from normal and OA human cartilage differing in the severity of the disease process. Results show that MMP-13 is able to degrade all four SLRPs, with fibromodulin and biglycan being preferential substrates.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Specimen selection**

Normal human cartilage (femoral condyles and tibial plateaus) was obtained from individuals within 12 hours of death at time of autopsy (n = 3; mean age  $\pm$  SD 52  $\pm$  14). These individuals had no history of joint disease and died of causes unrelated to arthritic diseases, including cardiorespiratory arrest, cerebral hemorrhage and

pulmonary embolism. The tissue was examined macroscopically and histologically to ensure that only normal tissue was used.

OA human cartilage (femoral condyles and tibial plateaus) was obtained from patients undergoing total knee arthroplasty ( $n = 9$ ; mean age  $\pm$  SD  $76 \pm 5$  years). All patients were evaluated by a certified rheumatologist who used the American College of Rheumatology criteria for OA of the knee [26]. These specimens represented early, moderate or severe OA, as defined by microscopic criteria [27-29]. The Clinical Research Ethics Committee of the University of Montreal Hospital Center approved the study protocol and the use of human tissues.

#### **Proteoglycan extraction**

Proteoglycans were extracted with 4 M guanidinium chloride [30, 31]. Briefly, cartilage was finely diced to pieces and extracted with 4 M guanidinium chloride (Invitrogen Inc; Carlsbad, CA) in 0.1 M sodium acetate, pH 6.0, containing the protease inhibitors [leupeptin (10  $\mu$ g/ml), pepstatin (10  $\mu$ g/ml), aprotinin (10  $\mu$ g/ml), phenanthroline (10  $\mu$ g/ml), and phenylmethanesulphonyl fluoride (100  $\mu$ g/ml) (EMD Biosciences Inc., La Jolla, CA)], at 4°C with continuous stirring for 48 hours. The extract was separated from the cartilage residue by filtration through glass wool.

#### **Analysis of SLRP cleavage by MMP-13**

MMP-13 proteolytic activity was analyzed on human normal ( $n = 3$ ) and OA cartilage having different levels of fibrillation corresponding to the different stage of the disease process. These were named slightly ( $n = 3$ ), moderately ( $n = 3$ ) and severely ( $n = 3$ ) fibrillated cartilage. Proteoglycan extracts were incubated with 100 ng/ml of the human recombinant (rh) MMP-13 (R&D Systems Inc., Minneapolis,

MN) activated with 0.5 mM APMA (Kodak Inc., Toronto, ON, Canada) in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05 % Brij 35 (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada) at an MMP-13/glycosaminoglycan ratio of 1:50. Glycosaminoglycan content was determined by the DMMB method [32]. The reaction was stopped by the addition of 15 mM EDTA (Sigma-Aldrich Canada Ltd.). The samples were treated with 25 mU chondroitinase ABC (#C-2905; Sigma-Aldrich Canada Ltd.)/100 µl proteoglycan extract, overnight at 37°C.

In order to investigate the MMP-13 specificity, RO 110-2481, a synthetic specific MMP-13 carboxylate inhibitor generously provided by C. Myers (Roche Bioscience, Palo Alto, CA), was used. Briefly, samples from moderately fibrillated cartilage extract were treated with rhMMP-13 and RO 110-2481 at 1 and 50 nM for the indicated time, and samples processed for Western blotting.

### **Western blotting**

Proteoglycan solutions were mixed with a sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% w/v SDS, 10% glycerol, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, and 0.05% bromophenol blue) and electrophoresed on 4-20% Ready-Gels (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, ON, Canada), then transferred electrophoretically to nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories Ltd.) and processed for Western immunoblotting. Blots were blocked in 2% low-fat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich Canada Ltd.). As described previously [13], rabbit polyclonal antibodies against the carboxyl-terminus of the SLRP core proteins were used as primary antibodies for the detection of biglycan (1/5000 dilution), fibromodulin (1/10000 dilution), lumican (1/5000 dilution), and decorin (1/5000 dilution). The second antibody was a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin (1/10000 dilution; Pierce, Rockford, IL). Detection was performed by chemiluminescence with the Super Signal<sup>R</sup> ULTRA chemiluminescent substrate (Pierce), according to the manufacturer's specifications.

### **Sequencing of biglycan and decorin degradation products**

Bovine recombinant biglycan (15  $\mu$ g) and decorin (15  $\mu$ g) (Sigma-Aldrich Canada Ltd.) were incubated for 1 hour at 37°C with APMA-activated rhMMP-13 in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 10 mM CaCl<sub>2</sub> and 0.05% Brij 35. The reaction was stopped by the addition of 15 mM EDTA. Glycosaminoglycan chains were removed by incubation with 0.1 unit chondroitinase ABC (#C-3667; Sigma-Aldrich Canada Ltd.) for 8 hours at room temperature, followed by boiling for 5 minutes with the electrophoresis sample buffer. To remove Asn-linked oligosaccharides, N-glycanase

(0.3 unit; Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) and sample buffer containing 1.2% Nonidet P-40 (Roche Diagnostics) were added to the solution, which was then incubated again for 12 hours at room temperature. Degradation products were separated in 4-20% polyacrylamide gels (Bio-Rad Laboratories Ltd.). After electrophoresis, the gels were soaked in CAPS transfer buffer (10 nM 3-cyclohexylamino-1-propanesulfonic acid, 10% methanol, pH 11.0). After washing, the proteins were transferred for 15 minutes at 0.25 A onto PVDF membranes (Millipore Corporation, Bedford, MA), which were washed in deionized water, stained with 0.1% Coomassie Blue in 50% methanol for 5 minutes, and then destained in 50% methanol, 10% acetic acid for 5-7 minutes at room temperature. Finally, the membrane was rinsed in deionized water, air dried and stored at room temperature. N-terminal amino acid sequencing of the protein band was performed on a Procise Protein Sequencer model 492 (Applied Biosystems).

## **RESULTS**

### **MMP-13-induced biglycan and decorin degradation**

Biglycan in human normal and OA cartilage migrated as a doublet at 48 and 45 kDa, representing intact and N-terminally processed biglycan. MMP-13 degradation of biglycan was detected at 0.25 hours of incubation, and was almost completed at 2 hours (Figure 1). A fragment of about 28 kDa was generated. The biglycan profile from normal (non-fibrillated) to moderately fibrillated cartilage was similar whether the specimens were incubated in the presence or absence of MMP-13. Of note, in the specimens from non-fibrillated to moderately fibrillated cartilage not treated with MMP-13, the biglycan MMP-13 degradation product was already present, although

in low amounts. Under MMP-13 treatment, there was an increase of the degradation product until complete digestion of the substrate. Interestingly, but not unexpected, in the severely fibrillated cartilage, the biglycan appeared to be in low abundance, possibly due to prior degradation and loss from the tissue. However, MMP-13 further cleaved the residual substrate.

To determine whether MMP-13 was the only enzyme responsible for the cleavage, and not enzymes present in the cartilage extracts, we further treated the samples from the moderately fibrillated cartilage with two concentrations (1 and 50 nM) of a preferential inhibitor of MMP-13, RO 110-2481 [26]. Biglycan degradation was completely prevented at both concentrations tested (Figure 1).

Decorin from normal and OA cartilage migrated as a single band of about 45 kDa. MMP-13 degradation of decorin was not detected until 4-8 hours of incubation, and proteolysis was complete by 16 hours (Figure 2). Two decorin fragments of about 30 and 28 kDa were detected. There was no major difference in the degradation pattern with the normal to moderately fibrillated cartilage. In the severely fibrillated cartilage, although the rate of MMP-13 degradation was similar to the other cartilage categories, no decorin fragment could be seen. The ability of MMP-13 to degrade decorin was prevented in the presence of RO 110-2481, but only at the higher concentration tested (50 nM) (Figure 2).

#### **MMP-13 cleavage sites of biglycan and decorin**

N-terminal amino acid sequence analysis of the biglycan fragments generated by MMP-13 treatment revealed a novel major cleavage site at the G<sub>178/179</sub>VFSG. Fragments of 28 and 22 kDa were obtained, both of which possessed the same amino

terminal sequence. This suggests that MMP-13 is also able to cleave at a second, as yet unidentified, site closer to the carboxyl terminus of biglycan (Figure 3).

Sequence analysis of the two decorin cleavage fragments of 28 and 26 kDa showed that they possessed the same N-terminal sequence as the mature decorin core protein (Figure 4).

The SLRP fragment sizes visualized on the gel used for sequencing were smaller than those observed on the gel used for Western blotting due to the treatment with N-glycanase in the former procedure.

#### **Degradation of fibromodulin and lumican**

Fibromodulin from normal and OA cartilage migrated as a single component of about 60 kDa. MMP-13 induces fibromodulin degradation in a time-dependent fashion, being detectable after 1-2 hours of incubation and complete by 16 hours (Figure 5). In the moderately and severely fibrillated cartilage, a degradation product of about 33 kDa was generated early under MMP-13 treatment. The fragment initially increased in abundance with incubation time, and thereafter declined as the fibromodulin was further degraded. The specific MMP-13 inhibitor prevented the fibromodulin degradation, but in a dose-dependent manner (Figure 5).

Lumican also migrated as a single component of 60 kDa. MMP-13-induced degradation was detected only after 8-16 hours of incubation (Figure 6). A fragment of about 30 kDa was observed only with the severely fibrillated cartilage. As for the other SLRPs, the specificity of MMP-13 was verified on extracts from moderately fibrillated OA cartilage, where lumican degradation was prevented by the treatment with the MMP-13 specific inhibitor in a dose dependent manner (Figure 6).

## DISCUSSION

A major and early feature of cartilage degeneration is proteoglycan breakdown. MMP-13 has been shown to play an important role in OA cartilage degeneration by its effect not only on the collagen network but also on proteoglycans [3]. In this study, we investigated the ability of human MMP-13 to act on members of the SLRP proteoglycan family derived from human cartilage from normal to advanced OA.

One of the emerging observations is that biglycan and fibromodulin are preferential substrates for MMP-13, while the degradation of decorin and lumican is much less effective. This could imply that biglycan and fibromodulin are sensitive to both the gelatinolytic and collagenolytic activities of MMP-13, while decorin and lumican are more responsive to the gelatinolytic cleavage. Support of this hypothesis is provided by Imai et al [2], who showed that decorin could be cleaved by MMP-2, -3, and -7, whereas cleavage with MMP-1 was negligible. The greater effect of MMP-13 than MMP-1 on decorin could be due to the fact that the former enzyme has 44 times more gelatinolytic activity than MMP-1 [33]. Moreover, and in agreement with this hypothesis, only 1 nM of inhibitor RO 110-2481 is sufficient to prevent collagenolytic activity, but 50 nM is required to prevent gelatinolytic activity [34], and the effect of MMP-13 on biglycan and fibromodulin is abolished at both inhibitor concentrations whereas the effect on decorin and lumican is abolished only at the higher concentration.

Biglycan is found in the pericellular matrix of many connective tissues, and appears to play a role in regulating morphogenesis and differentiation [35]. Although biglycan is present in cartilage and is up-regulated in the late stages of OA [12], its

exact role in OA still remains to be determined. The present study showed that the degree of biglycan degradation was independent of the extent of cartilage damage, though the amount of biglycan present in the severely fibrillated cartilage was significantly less than in normal to moderately fibrillated specimens. This suggests that in the severely fibrillated specimens, biglycan has already been extensively degraded, leading to the loss of the epitope recognized by the antibody. Our data also showed that MMP-13 induces two main biglycan fragments. The larger fragment possessed a new cleavage site, (...G<sub>178/179</sub>VFSG) in the leucine-rich region. The second smaller fragment possessed the same amino terminal sequence, indicating the presence of a second cleavage site. As the antibody used for immunodetection recognizes the C-terminal region of biglycan, cleavage at this second site would prevent detection of the smaller fragment by immunoblotting.

As mentioned above, Imai et al demonstrated the ability of three MMPs, MMP-2, -3, and -7, to degrade decorin, and reported multiple cleavage sites [2]. It seems likely that these MMPs cleaved within the leucine-rich region at different sites, as all fragments albeit of different sizes possessed the same N-terminal sequence corresponding to that of the intact decorin core protein [2]. The present study revealed that MMP-13 degrades decorin into two fragments that also possessed the same N-terminal sequence as the intact decorin core protein. The size of the fragments suggests that these cleavage sites also reside within the leucine-rich region. As the degradation of decorin by MMP-13 appears due to its gelatinase activity rather than its collagenase activity, it is likely that one of the MMP-13 cleavages could be at the L<sub>242/243</sub>KGLN site, which is the cleavages used by

gelatinase A (MMP-2) [2], and the other fragment would then be due to a cleavage N-terminal of this site. This L<sub>242/243</sub>KGLN cleavage site is very plausible for MMP-13, as it is between aliphatic and hydrophobic amino acids, which are preferred by MMPs [36].

Interestingly, one of the characteristics of decorin is its interaction with active TGF- $\beta$ , thereby providing a tissue reservoir of this factor [37]. Our data showing MMP-13 cleavage in the leucine-rich repeats suggests the possibility that TGF- $\beta$  may be released from the decorin after digestion with this MMP. We reported in a previous work that in OA cartilage, the TGF- $\beta$  level is up-regulated and responsible for the in situ increase of MMP-13 in this disease tissue [28]. The effect of MMP-13 on decorin, although not a preferential substrate, could be threefold. It may permit collagen degradation by its loss from the surface of the collagen fibrils; since data suggest that the leucine-rich repeats play a critical role in the interaction of SLRPs with collagens [38]; it may result in loss of tissue integrity through the functional failure of decorin and biglycan interactions; and it may promote tissue degradation via TGF $\beta$  release leading to increased MMP-13 production.

Lumican was reported to be present in human cartilage [39], but no direct evidence of its involvement in human OA has yet been reported. Young et al [13], however, recently showed that lumican is up-regulated in an ovine meniscectomy model of OA. This up-regulated expression in degenerative cartilage was associated with increased lumican core protein deficient in keratan sulfate chains [13]. The present study demonstrated that lumican is digested by MMP-13, and its sensitivity to digestion appeared independent of the level of degradation of the cartilage from

which it was extracted. This may indicate that lumican degradation is independent of interactions with the various components in the different cartilage extracts.

Fibromodulin cleavage by MMP-13 has been previously demonstrated [19]. In human fibromodulin cleavage occurs at the Y<sub>63-64</sub>TYGS site in the N-terminal region of the molecule [19]. In the present study MMP-13 degradation of fibromodulin generated a fragment of 30 kDa, which presumably corresponds to the fragment described by Heathfield et al [19]. Of note, this fragment is generated in moderately and severely fibrillated cartilage, but not in normal or slightly fibrillated cartilage, reflecting an increased sensitivity of fibromodulin to degradation when the cartilage is more degenerated. This could be related to the presence of other components in the cartilage extracts that interact with the fibromodulin. Varying abundance of such components between the differently affected cartilages could then influence MMP-13 cleavage. The work by Heathfield et al suggests that cleavage of fibromodulin is dependent on its ability to bind type II collagen [19]. There are two possibilities that could explain this situation. First, the ability of isolated SLRPs interact with one another could result in the cleavage site being hidden. The recent description of decorin adopting a dimeric conformation in both the solution and crystal state may relate to this hypothesis, if other SLRPs behave in a similar manner [40]. It is possible that this dimeric conformation is removed when the SLRP binds to collagen and the MMP-13 cleavage site is then exposed. A second hypothesis could be that isolated SLRPs can act as zinc-binding proteins [41]. If this is a property of only the free SLRP, then in the absence of collagen or other binding partner the molecules could remove the active site zinc necessary for MMP-13 function.

Although MMP-13 was shown to degrade type II collagen fibrils efficiently [42], it is possible that in vivo SLRP interaction may help protect the fibrils by impeding access to the collagenase cleavage site. Data from this study are of importance in human OA pathophysiology, as MMP-13-induced SLRP degradation may represent an initial event in collagen fibril degradation, by exposing the collagen fibrils to proteolytic attack and permitting subsequent cartilage degeneration. In vivo identification of the SLRP degradation products, especially those of biglycan and fibromodulin, may assist in an early detection of degeneration in OA cartilage.

## CONCLUSION

In this study we demonstrated, for the first time, the ability of human recombinant MMP-13 to cleave members of two classes of SLRPs (decorin, biglycan, fibromodulin and lumican) derived from normal and OA human cartilage differing in severity of the disease process. Although minimal cleavage of decorin and lumican was observed, cleavage of fibromodulin and biglycan was extensive, suggesting that both molecules are preferential substrates. We demonstrated that fibromodulin has a higher level of degradation with increased cartilage damage. We also characterized a novel major cleavage site for biglycan and a potential cleavage site for decorin. We hypothesized that MMP-13-induced SLRP degradation may represent an early critical event in the process of cartilage degradation. Awareness of the SLRP degradation products may assist in an early detection of OA cartilage degradation.

**DECLARATION OF COMPETING INTERESTS**

None declared.

**COPYRIGHT**

The Corresponding Author grants on behalf of all authors an exclusive licence (or non exclusive for government employees) on a worldwide basis to the BMJ Publishing Group Ltd to permit this article (if accepted) to be published in ARD and any other BMJPGJL products and sublicences such use and exploit all subsidiary rights, as set out in your licence

<http://ard.bmjournals.com/misc/ifora/licenceform.shtml>

### **AUTHORS' CONTRIBUTIONS**

JM, GT, PR, PR, JPP, JMP contributed to the study design. JM, FM, JMP performed the acquisition of data. JM, GT, PR, PR, JPP, JMP analysed and interpreted the data. JM, PR, JMP prepared the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

We would like to thank Christelle Boileau, PhD, Alexander Watson, BSc, Changshan Geng, MD, MSc, David Hum, MSc, Martin Boily, MSc and François Jolicoeur, MSc, for their outstanding technical support, Pierre Pépin, MSc, from Sheldon Biotechnology for his assistance in protein sequencing, and C. Myers from Roche Bioscience, Palo Alto, CA for providing the MMP-13 inhibitor. The authors also thank Santa Fiori and Virginia Wallis for their assistance in the manuscript preparation.

**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1.** Representative western blot of time course of MMP-13-induced degradation of biglycan. Human articular cartilage extracts were incubated with APMA-activated MMP-13 for the indicated time (0-16 hours). Panels are for extracts from normal (non fibrillated) cartilage, or from slightly, moderately and severely fibrillated OA cartilage. The bottom panel relates to the extract from moderately fibrillated OA cartilage incubated for 1.5 hours with APMA-activated MMP-13 in the absence or presence of 50 or 1 nM RO 110-2481, a preferential MMP-13 inhibitor.

**Figure 2.** Representative western blot of time course of MMP-13-induced degradation of decorin. Human articular cartilage extracts were incubated with APMA-activated MMP-13 for the indicated time (0-16 hours). Panels are for extracts from normal (non fibrillated) cartilage, or from slightly, moderately and severely fibrillated OA cartilage. The bottom panel relates to the extract from moderately fibrillated OA cartilage incubated for 16 hours with APMA-activated MMP-13 in the absence or presence of 50 or 1 nM RO 110-2481, a preferential MMP-13 inhibitor.

**Figure 3.** Schematic representation of biglycan cleavage sites generated by APMA-activated MMP-13. The arrow indicates the MMP-13 cleavage site, and the broken arrow the potential secondary MMP-13 cleavage site.

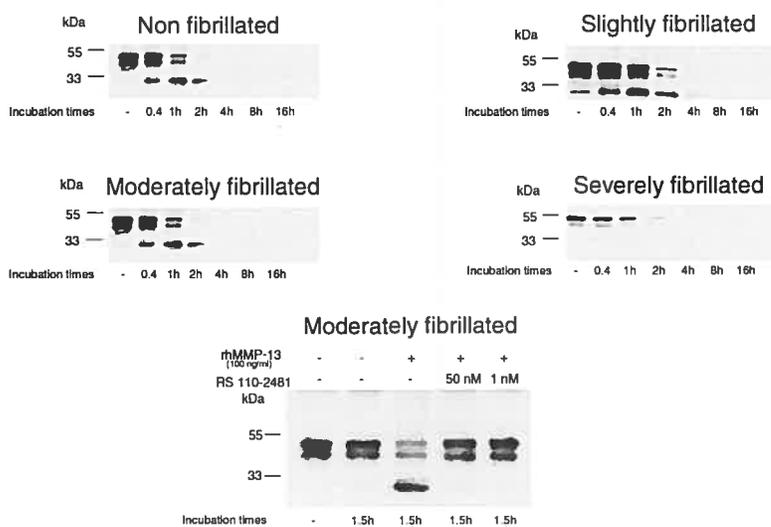
**Figure 4.** Schematic representation of decorin cleavage sites generated by APMA-activated MMP-13. The broken arrows indicate the potential MMP-13 cleavage sites.

**Figure 5.** Time course of MMP-13 induced fibromodulin degradation. For further details see legend of Figure 1.

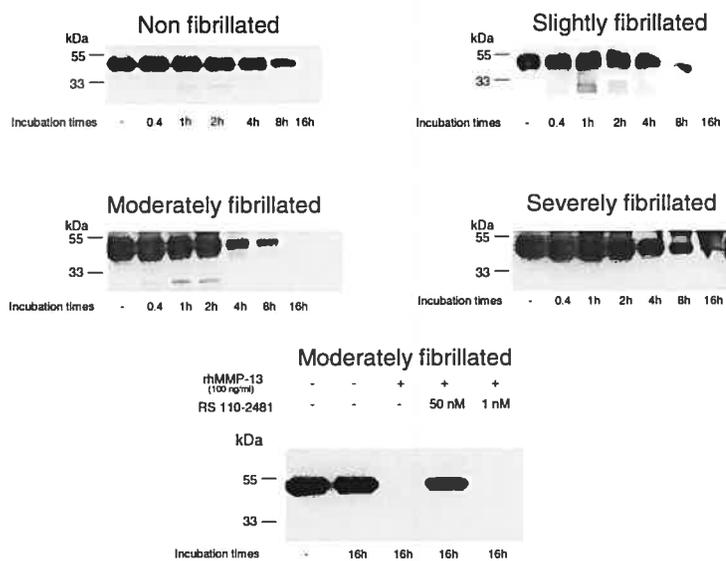
**Figure 6.** Time course of MMP-13 induced lumican degradation. For further details see legend of Figure 2.

## FIGURES

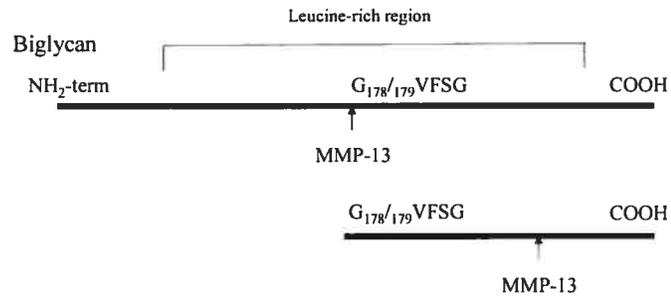
Monfort et al, Figure 1



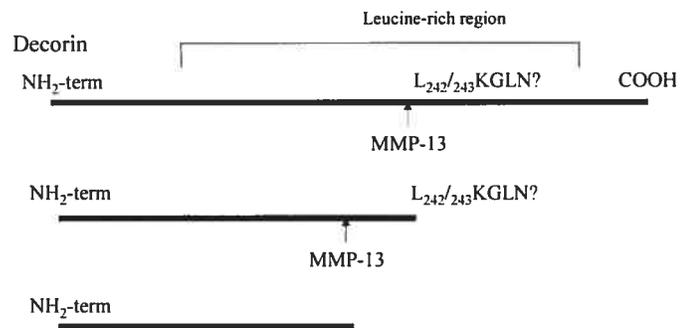
Monfort et al, Figure 2



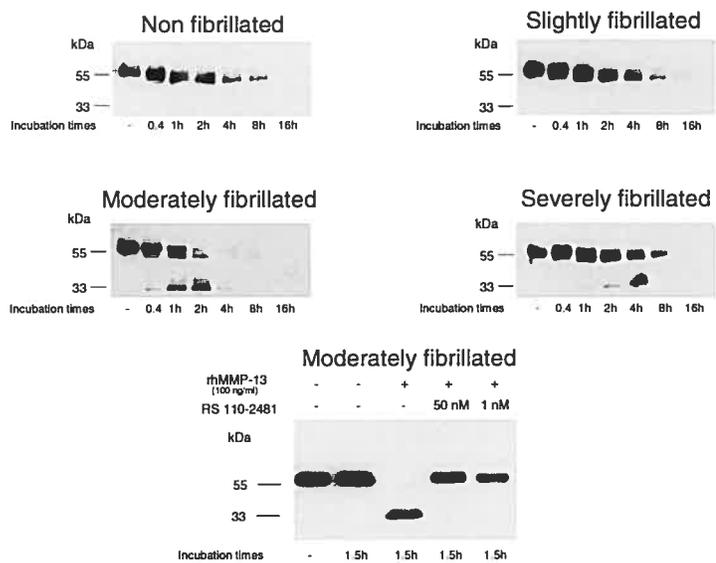
Monfort et al, Figure 3



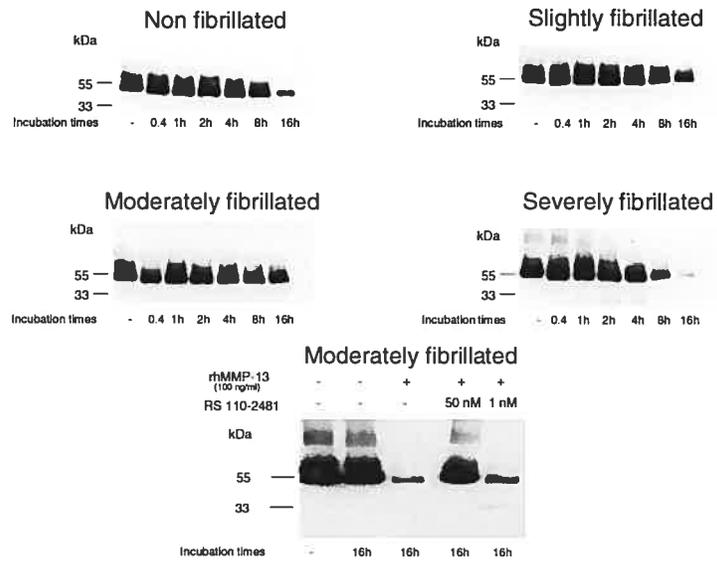
Monfort et al, Figure 4



Monfort et al, Figure 5



Monfort et al, Figure 6



## REFERENCES

1. Heinegard D, Bayliss, M. Lorenzo P. **Pathogenesis of structural changes in the osteoarthritic joint.** In *Osteoarthritis*. Edited by Brandt, Doherty, Lohmander. New York:Oxford University Press Inc.; 2003:73-92.
2. Imai K, Hiramatsu A, Fukushima D, Pierschbacher MD, Okada Y: **Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release.** *Biochem J* 1997, **322 ( Pt 3):**809-814.
3. Kjellen L, Lindahl U: **Proteoglycans: structures and interactions.** *Annu Rev Biochem* 1991, **60:**443-475.
4. Poole AR. **Cartilage in Health and Disease.** In *Arthritis and Allied Conditions*. Edited by Koopman, Moreland. Philadelphia:Lippincott, Williams & Wilkins; 2005:223-269.
5. Bech-Hansen NT, Naylor MJ, Maybaum TA, Sparkes RL, Koop B, Birch DG, Bergen AA, Prinsen CF, Polomeno RC, Gal A, Drack AV, Musarella MA, Jacobson SG, Young RS, Weleber RG: **Mutations in NYX, encoding the leucine-rich proteoglycan nyctalopin, cause X-linked complete congenital stationary night blindness.** *Nat Genet* 2000, **26:**319-323.
6. Knudson CB, Knudson W: **Cartilage proteoglycans.** *Semin Cell Dev Biol* 2001, **12:**69-78.
7. Hedlund H, Mengarelli-Widholm S, Heinegard D, Reinholt FP, Svensson O: **Fibromodulin distribution and association with collagen.** *Matrix Biol* 1994, **14:**227-232.
8. Lorenzo P, Aspberg A, Onnerfjord P, Bayliss MT, Neame PJ, Heinegard D: **Identification and characterization of asporin. a novel member of the leucine-rich repeat protein family closely related to decorin and biglycan.** *J*

*Biol Chem* 2001, **276** :12201-12211.

9. Sztrolovics R, White RJ, Poole AR, Mort JS, Roughley PJ: **Resistance of small leucine-rich repeat proteoglycans to proteolytic degradation during interleukin-1-stimulated cartilage catabolism.** *Biochem J* 1999, **339** ( Pt 3):571-577.
10. Bengtsson E, Morgelin M, Sasaki T, Timpl R, Heinegard D, Aspberg A: **The leucine-rich repeat protein PRELP binds perlecan and collagens and may function as a basement membrane anchor.** *J Biol Chem* 2002, **277**:15061-15068.
11. Mansson B, Wenglen C, Morgelin M, Saxne T, Heinegard D: **Association of chondroadherin with collagen type II.** *J Biol Chem* 2001, **276**:32883-32888.
12. Bock HC, Michaeli P, Bode C, Schultz W, Kresse H, Herken R, Miosge N: **The small proteoglycans decorin and biglycan in human articular cartilage of late-stage osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2001, **9**:654-663.
13. Young AA, Smith MM, Smith SM, Cake MA, Ghosh P, Read RA, Melrose J, Sonnabend DH, Roughley PJ, Little CB: **Regional assessment of articular cartilage gene expression and small proteoglycan metabolism in an animal model of osteoarthritis.** *Arthritis Res Ther* 2005, **7**:R852-861.
14. Melching LI, Roughley PJ: **The synthesis of dermatan sulphate proteoglycans by fetal and adult human articular cartilage.** *Biochem J* 1989, **261**:501-508.
15. Winnemoller M, Schon P, Vischer P, Kresse H: **Interactions between thrombospondin and the small proteoglycan decorin: interference with cell attachment.** *Eur J Cell Biol* 1992, **59**:47-55.
16. Winnemoller M, Schmidt G, Kresse H: **Influence of decorin on fibroblast adhesion to fibronectin.** *Eur J Cell Biol* 1991, **54**:10-17.

17. Iozzo RV: **Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function.** *Annu Rev Biochem* 1998, **67**:609-652.
18. Poole AR, Rosenberg LC, Reiner A, Ionescu M, Bogoch E, Roughley PJ: **Contents and distributions of the proteoglycans decorin and biglycan in normal and osteoarthritic human articular cartilage.** *J Orthop Res* 1996, **14**:681-689.
19. Heathfield TF, Onnerfjord P, Dahlberg L, Heinegard D: **Cleavage of fibromodulin in cartilage explants involves removal of the N-terminal tyrosine sulfate-rich region by proteolysis at a site that is sensitive to matrix metalloproteinase-13.** *J Biol Chem* 2004, **279**:6286-6295.
20. Chakravarti S, Stallings RL, SundarRaj N, Cornuet PK, Hassell JR: **Primary structure of human lumican (keratan sulfate proteoglycan) and localization of the gene (LUM) to chromosome 12q21.3-q22.** *Genomics* 1995, **27**:481-488.
21. Dolhnikoff M, Morin J, Roughley PJ, Ludwig MS: **Expression of lumican in human lungs.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998, **19**:582-587.
22. Svensson L, Narlid I, Oldberg A: **Fibromodulin and lumican bind to the same region on collagen type I fibrils.** *FEBS Lett* 2000, **470**:178-182.
23. Chakravarti S, Magnuson T, Lass JH, Jepsen KJ, LaMantia C, Carroll H: **Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican.** *J Cell Biol* 1998, **141**:1277-1286.
24. Li Y, Aoki T, Mori Y, Ahmad M, Miyamori H, Takino T, Sato H: **Cleavage of lumican by membrane-type matrix metalloproteinase-1 abrogates this proteoglycan-mediated suppression of tumor cell colony formation in soft agar.** *Cancer Res* 2004, **64**:7058-7064.
25. Fosang AJ, Last K, Knauper V, Murphy G, Neame PJ: **Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13).** *FEBS Lett* 1996, **380**:17-20.

26. Altman RD, Asch E, Bloch DA, Bole G, Borenstein D, Brandt KD, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M, Howell DS, Kaplan D, Koopman W, Longley SI, Mankin HJ, McShane DJ, Medsger TAJr, Meehan R, Mikkelsen W, Moskowitz RW, Murphy W, Rothschild B, Segal L, Sokoloff L, Wolfe F: **Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee.** *Arthritis Rheum* 1986, **29**:1039-1049.
27. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A: **Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data.** *J Bone Joint Surg Am* 1971, **53**:523-537.
28. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Howell DS, Ghandur-Mnaimneh L, Enis JE, Woessner JF Jr.: **Collagenase and collagenolytic activity in human osteoarthritic cartilage.** *Arthritis Rheum* 1983, **26**:63-68.
29. Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Cloutier JM, Howell DS, Ghandur-Mnaimneh L, Woessner JF Jr.: **Neutral proteases capable of proteoglycan digesting activity in osteoarthritic and normal human articular cartilage.** *Arthritis Rheum* 1984, **27**:305-312.
30. Roughley PJ, White RJ, Poole AR: **Identification of a hyaluronic acid-binding protein that interferes with the preparation of high-buoyant-density proteoglycan aggregates from adult human articular cartilage.** *Biochem J* 1985, **231**:129-138.
31. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Cloutier JM, Woessner JF Jr: **Proteoglycan-degrading acid metalloprotease activity in human osteoarthritic cartilage, and the effect of intraarticular steroid injections.** *Arthritis Rheum* 1987, **30**:541-548.
32. Farndale RW, Sayers CA, Barrett AJ: **A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures.** *Connect*

*Tissue Res* 1982, **9**:247-248.

33. Knauper V, Lopez-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G: **Biochemical characterization of human collagenase-3.** *J Biol Chem* 1996, **271**:1544-1550.
34. Billingham RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C, Mitchell P, Hambor J, Diekmann O, Tschesche H, Ch□e□n J, Van Wart H, Poole AR: **Enhanced cleavage of Type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage.** *J Clin Invest* 1997, **99**:1534-1545.
35. Scott JE: **Proteoglycan: collagen interactions in connective tissues. Ultrastructural, biochemical, functional and evolutionary aspects.** *Int J Biol Macromol* 1991, **13**:157-161.
36. Nagase H: **Activation mechanisms of matrix metalloproteinases.** *Biol Chem* 1997, **378**:151-160.
37. Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E: **Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin.** *Nature* 1990, **346**:281-284.
38. Svensson L, Heinegard D, Oldberg A: **Decorin-binding sites for collagen type I are mainly located in leucine-rich repeats 4-5.** *J Biol Chem* 1995, **270**:20712-20716.
39. Grover J, Chen XN, Korenberg JR, Roughley PJ: **The human lumican gene. Organization, chromosomal location, and expression in articular cartilage.** *J Biol Chem* 1995, **270**:21942-21949.
40. Scott PG, McEwan PA, Dodd CM, Bergmann EM, Bishop PN, Bella J: **Crystal structure of the dimeric protein core of decorin, the archetypal small leucine-rich repeat proteoglycan.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:15633-15638.
41. Kojoh K, Fukuda E, Matsuzawa H, Wakagi T: **Zinc-coordination of aspartic acid-76 in Sulfolobus ferredoxin is not required for thermal stability of the**

**molecule.** *J Inorg Biochem* 2002, **89**:69-73.

42. Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J: **The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes: A role in osteoarthritis.** *J Clin Invest* 1996, **97**:2011-2019.

## DISCUSSION

Les principales macromolécules de la matrice du cartilage articulaire sont les protéoglycanes qui en assurent l'élasticité et le collagène, responsable des propriétés de tension de ce tissu. Le principal type de collagène du cartilage est celui de type II, représentant environ 90% du collagène total. Dans le cartilage normal, les chondrocytes maintiennent un équilibre dynamique entre les processus de synthèse et de dégradation des composantes de la matrice, de sorte qu'une concentration constante de ces composantes est maintenue. Dans les maladies dégénératives comme l'arthrose, cet équilibre est perturbé. La dégradation du collagène et des protéoglycanes excède celle de leur synthèse (152). Les données biochimiques concordent avec un déficit du réseau de collagène du cartilage, qui semble dû à une rupture du lien entre les fibres de collagène adjacentes à la matrice (153-156). Ces altérations sont les plus précoces et semblent irréversibles. De plus, la destruction des protéoglycanes est elle aussi un facteur majeur et précoce de la dégénérescence du cartilage.

Un protéoglycane majeur de la matrice extracellulaire du cartilage est l'aggrécane. Il confère à ce tissu sa résistance à la compression. L'aggrécane est coupé dans le cartilage humain OA. Cette digestion est réalisée par une famille d'enzyme appartenant aux métalloprotéases, les ADAMTS ou aggrécanasés. Les ADAMTS-4 (aggrécanasé-1) et -5 (aggrécanasé-2) ont été étudiées dans l'OA et leur importance dans la dégradation du cartilage a été démontrée (150;151).

La dégradation des principaux éléments de la matrice extracellulaire du cartilage résulte d'une augmentation de l'activité d'enzymes protéolytiques, plus particulièrement de celle des MMPs (152). Les premiers travaux sur ces enzymes ont d'abord suggéré que la dégradation initiale du collagène dans ce tissu résulterait de l'action de la collagénase-1 (MMP-1), quoique la présence de cette enzyme n'expliquait pas toutes les manifestations pathologiques retrouvées dans le cartilage. La découverte de la MMP-13 (collagénase-3) et la démonstration de son implication dans l'arthrose (124;129) a remis en question l'importance de la MMP-1 seule. En effet, la MMP-13 est capable de scinder le collagène de type II au niveau de la triple

hélice avec une vitesse catalytique de 5 à 10 fois plus élevée que celle de la MMP-1, et contrairement à celle-ci, la MMP-13 se retrouve préférentiellement dans le cartilage; de plus, son niveau d'expression est plus élevé dans le tissu OA que dans le tissu normal (124;129-131;136).

La MMP-13, en plus de son rôle sur la dégradation du collagène dans le cartilage, joue un rôle très important dans la dégradation du cartilage dans l'OA aussi par son effet sur les protéoglycanes. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la capacité de la MMP-13 à agir sur les différents membres de la famille des SLRPs qui sont impliqués dans les interactions avec les fibres de collagène pour en réguler le diamètre et leur insertion latérale. Nous avons étudié l'activité de la MMP-13 sur les SLRPs dans des extraits de cartilage normal comparé aux OA à différentes étapes de dégénération. Des études précédentes ont montré que, dans le cartilage humain OA avec une atteinte modérée à sévère, trois des SLRPs, le biglycane, la fibromoduline et la décorine dans une moindre mesure, étaient déjà partiellement dégradés ou structurellement modifiés (91). Le travail décrit dans ces études suggère fortement que ceci est dû à l'habilité de la MMP-13 à agir sur les SLRPs. Ces données sont importantes pour la compréhension de la physiopathologie humaine étant donné que la protéolyse des SLRPs par la MMP-13 pourrait précéder la destruction du collagène et par conséquent initier la dégradation du cartilage.

Différents laboratoires se sont intéressés aux SLRPs. En particulier, les travaux de Schmidt et al (157) et Hausser et al (158) ont montré une digestion intracellulaire de la décorine dans des fibroblastes de la peau. Nos travaux ont montré que le biglycane et la fibromoduline sont des substrats préférentiels de la MMP-13 tandis que celle-ci est moins efficace sur la dégradation de la décorine et du lumican. On peut donc supposer que le biglycane et la fibromoduline sont sensibles à l'activité gélatinase et collagénase de la MMP-13, tandis que la décorine et le lumican ne sont sensibles qu'à l'activité gélatinase. En effet, Imai et al (148) ont montré que la décorine pouvait être clivée par les MMP-2, -3 et -7 mais que l'activité de la MMP-1 sur la décorine était négligeable. Nos expériences d'inhibition avec le

RO 110-2481, inhibiteur synthétique préférentiel de la MMP-13 supportent ces observations. En effet, des travaux précédents semblent suggérer que 1 nM de cet

inhibiteur prévient l'activité collagénase, tandis qu'il faut 50 nM pour inhiber l'activité gélatinase. (131)

Le biglycane se trouve dans la matrice péricellulaire de différents tissus conjonctifs où il joue un rôle dans la morphogénèse et dans la morphodifférenciation (91). Même si les études initiales n'ont pas montré de différences entre la quantité de biglycane dans le cartilage normal et OA (84), des études plus récentes ont montré que la synthèse de biglycane était augmentée dans les stades avancés de l'OA (91). Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à la capacité de la MMP-13 à dégrader le biglycane. Nous avons identifié deux fragments principaux. Le plus grand possède un nouveau site de coupure (...VPK<sub>178-179</sub>VFS) situé au milieu du domaine riche en leucine. Le deuxième fragment possède la même séquence en acide aminé N-terminale. Ceci indique la présence d'un deuxième site de coupure sur le premier fragment. Le fragment ne peut être identifié par immunobuvardage, étant donné que l'anticorps que nous avons utilisé pour l'immunodétection reconnaît la région C-terminale du biglycane, la coupure au deuxième site empêche donc la détection du petit fragment par immunoblot. Le niveau de dégradation du biglycane est indépendant du degré de dégradation du cartilage. Cependant, la quantité de biglycane présente dans le cartilage sévèrement fibrillé est significativement moins importante que dans le cartilage normal ou modérément fibrillé. Ceci suggère que dans les spécimens fibrillés, le biglycane est déjà extrêmement dégradé, conduisant donc à la perte de l'épitope reconnu par l'anticorps.

Imai et al ont montré que les MMP-2, -3 et -7 étaient capables de dégrader la décorine (148) et ont mis en évidence les sites de coupures. Toutes ces MMPs sont capables de couper dans la région riche en leucine car elles génèrent toutes des fragments de tailles différentes qui ont tous la séquence N-terminale correspondant à celle de la décorine intacte (148). Dans notre étude, nous avons montré la capacité de la MMP-13 à dégrader la décorine. Nous avons observé deux fragments qui possèdent la même séquence N-terminale que la décorine intacte. La taille de ces fragments suggère que les sites de coupure se situent aussi dans la région riche en leucine. Étant donné que la dégradation de la décorine par la MMP-13 semble due à son activité gélatinase plutôt que collagénase, il semble possible qu'un des sites de

coupure de la MMP-13 puisse être  $ASL_{242-243}KGL$ , site de coupure de la gélatinase A (MMP-2). Ce site se trouve entre les acides aminés aliphatiques et hydrophobes, site préférentiel de la MMP-13 (123). Cependant, d'autres études doivent confirmer cette hypothèse. Selon le site de coupure on déduit que la MMP-13 couperait au début du domain LRR-X. Le monomère de décorine perdrait les trois derniers domaines LRR de la région C-terminale. De cette manière cette structure serait tronquée et finalement serait modifiée la capacité d'union au substrat. Par homologie nous pourrions dire que MMP-13 coupe le biglycan au milieu du domain VII, ce qui affecterait gravement son union aux différents substrats (161). Par ailleurs, une des caractéristiques de la décorine est de lier le TGF $\beta$  actif, devenant ainsi un réservoir de cette molécule. Nos résultats montrant la coupure par la MMP-13 dans le site riche en leucine suggèrent la possibilité, comme Imai et al l'avaient rapporté, que le TGF $\beta$  puisse être libéré de la décorine après la digestion par cette MMP. Pelletier et al ont décrit la présence dans le cartilage OA de taux élevés de TGF $\beta$  (136). Ce dernier serait responsable de l'augmentation *in situ* de la MMP-13 dans le cartilage OA (136). L'effet de la MMP-13 sur la décorine, même s'il ne s'agit pas d'un substrat préférentiel, permettra en plus la dégradation du collagène par l'élimination du substrat interagissant avec ces fibres de collagène et l'augmentation du niveau de MMP-13 dans ce tissu.

La coupure de la fibromoduline par la MMP-13 a déjà été montrée (147). Dans la fibromoduline humaine, le clivage se produit au site  $PAY_{63-64}-TYG$  dans la région N-terminale de la molécule (147). Dans notre étude, la dégradation de la fibromoduline par la MMP-13 génère un fragment de 32 kDa, qui correspond en taille au fragment attendu si le clivage se produit dans la zone  $PAY_{63-64}-TYG$ . Il est intéressant de constater que ce fragment est généré dans le cartilage déjà fibrillé (modéré ou sévère) mais qu'il ne l'est pas dans le cartilage normal ou légèrement fibrillé. Ceci pourrait refléter une sensibilité accrue de la fibromoduline quand le cartilage est plus dégradé ou pourrait être relié à la présence d'autres composants dans les extraits de cartilage qui pourraient interagir avec la fibromoduline. En effet, nous avons travaillé avec un extrait de cartilage, et des quantités variables de ces composants dans les différents types de cartilage pourraient influencer le clivage par la MMP-13.

Le lumican est présent dans le cartilage humain (159) mais aucune preuve de son implication dans l'arthrose humaine n'a été jusqu'ici rapportée. Cependant, Young et al (160) ont récemment montré que le lumican est augmenté dans le cartilage arthrosique dans un modèle par ménissectomie chez l'ovin. Cette augmentation de l'expression du lumican dans le cartilage dégénératif est associée à une augmentation des noyaux protéiques de lumican déficient en chaînes de kératane sulfate. Dans notre étude, nous avons montré que le lumican était digéré par la MMP-13 et que la sensibilité à la digestion était indépendant du degré de dégradation du cartilage d'où il a été extrait.

Une des limitations de l'étude est que les extraits de cartilage digérés par MMP-13 sont analysés par immunoblot en utilisant des anticorps spécifiques pour la région C-Terminale. De cette manière on ne peut pas visualiser certains des fragments de dégradation (ceux-là qui perdent l'épitope C-Terminal). Quand on visualise la digestion de le peptide purifié (disponible commercialement) avec bleu de Commasie on peut voir le patron complet de dégradation.

Heathfield et al (147) ont conclu que le clivage de la fibromoduline est dépendant de sa capacité à se lier au collagène de type II. Deux possibilités expliqueraient ce fait. Tout d'abord, ceci peut impliquer la capacité des SLRPs à se lier les uns aux autres quand ils sont isolés, de telle sorte que le site de coupure est masqué. La description récente de la dimérisation de la décorine dans deux états, en solution et en cristaux, pourrait être reliée à cette hypothèse, si d'autres SLRPs se comportent de la même manière. Il est possible que cette conformation dimérique soit modifiée quand le SLRP est relié au collagène (161). D'autre part, les SLRPs isolés peuvent agir comme des protéines liant le zinc (162). Ainsi, ils capteraient les atomes de zinc nécessaires pour l'activité de la MMP-13.

La MMP-13 a la capacité de dégrader efficacement les fibres de collagène de type II (124). Il est possible que l'interaction avec les SLRPs puissent protéger les fibrilles en empêchant l'accès de la collagénase à son site de coupure. La dégradation des SLRPs induite par la MMP-13 pourrait représenter un évènement initial dans la dégradation des fibrilles de collagène en exposant le réseau de collagène. L'identification des produits de dégradation des SLRPs, notamment celui de

biglycane et de la fibromoduline, pourra nous aider à détecter précocément la dégradation du cartilage dans l'arthrose.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les propriétés particulières de la MMP-13 en ont fait une cible de choix, spécialement par les compagnies pharmaceutiques, dans la recherche de thérapies visant à diminuer l'activité collagénolytique dans le cartilage OA, soit par la recherche d'inhibiteurs spécifiques de son activité, soit par une inhibition de sa synthèse. Nous avons mis en évidence dans cette étude l'importance de la dégradation des SLRPs par la MMP-13. Ceci apporte des éléments nouveaux sur l'importance de la MMP-13 dans la dégradation de la matrice cartilagineuse dans l'arthrose.

Les perspectives futures de ce travail se divisent en 3 parties. La première consiste à étudier l'activité de la MMP-13 sur les SLRPs lorsqu'ils sont liés aux fibres de collagène de type II et de voir s'il y a des différences avec les fibres de type I. Le second volet consiste à étudier dans les détails un autre membre de la famille des SLRPs potentiellement digéré par la MMP-13, l'opticine. Enfin, une autre perspective de cette étude est de purifier les différentes isoformes de la MMP-13 afin d'en étudier l'activité enzymatique sur les protéoglycanes et les SLRPs.

Les SLRPs ont la capacité de lier les fibres de collagène. Cette liaison joue un rôle dans l'organisation des fibrilles. La fibromoduline a été le premier SLRP identifié comme substrat de la MMP-13 (147). Cette digestion intervenait lorsque la fibromoduline était liée au collagène de type II. Etant donné que les différents SLRPs ont de grandes similarités structurales et que le lumican et la décorine sont capables, tout comme la fibromoduline, de coiffer le collagène de type II, il paraît important d'étudier la digestion des SLRPs quand ils sont liés au collagène et mettre en évidence une éventuelle différence avec leurs formes isolées.

L'opticine est un membre de la classe 3 de la famille des SLRPs. Elle a été initialement identifiée dans la cornée humaine. La matrice extracellulaire de ce tissu montre certaines similarités avec celle du cartilage. Qui plus est, l'opticine est elle aussi capable de lier le collagène de type II. Il est donc pertinent que la poursuite de ce travail s'effectue sur l'expression de l'opticine dans le cartilage articulaire humain et d'en étudier la dégradation par la MMP-13. Nos données préliminaires de réaction

de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative, d'immunobuvardage et d'immunohistochimie montrent la présence de l'opticine dans le cartilage articulaire normal et OA et qu'il y aurait des différences non pas dans le nombre de chondrocytes produisant cet SLRP, mais dans le niveau d'opticine retrouvé dans la matrice normale et OA. Ainsi, le cartilage OA aurait peu d'opticine dans sa matrice comparé au normal.

Enfin, contrairement aux gènes des autres MMPs qui sont transcrits en un seul ARNm, le gène de la MMP-13 est transcrit en deux ARNm principaux de 2.5 et 3.0 kb. Un transcrit mineur d'environ 2.2/ 2.0 kb est aussi parfois détecté (124). Le criblage d'une banque d'ADN complémentaire (ADNc) et d'ARN total de chondrocytes humains par PCR avec différentes amorces a permis de déterminer la présence des transcrits de la MMP-13 humaine et quatre types différents ont été isolés (143).

Le séquençage des ADNs complémentaires à ces ARNm a révélé qu'ils étaient formés suite à des processus différents (143): utilisation de différents sites de polyadénylation (COL3-APS), utilisation de différents sites de début de transcription (COL3-ATS), délétion interne (COL3-DEL) et épissage alternatif (COL3-9B-2). Le transcrit COL3-APS comprend toute la région codante de la MMP-13 originale ainsi que le même site de début de transcription. Il diffère par l'utilisation d'un site différent de polyadénylation, ce qui rend la région 3'-non-traduite plus courte. Un transcrit de ce genre coderait pour une protéine identique à la MMP-13 originale et correspondrait à l'un des transcrits majeurs (2.5 kb) détecté par transfert Northern. Le deuxième type retrouvé, COL3-DEL, comprend une région codante identique à celle de la MMP-13 originale, sauf pour la présence d'une délétion interne de 387 pb, située dans le domaine hémapexine de l'enzyme. COL3-DEL peut en théorie coder pour une protéine qui aurait une région N-terminale (séquence signal et sites d'activation) identique à l'originale, mais, à cause de la délétion dans la région hémapexine, aurait une activité enzymatique différente, puisque cette région est essentielle à l'activité collagénolytique des collagénases (126). Le troisième transcrit, COL3-9B-2, diffère du transcrit original par la présence d'un exon supplémentaire résultant d'un épissage alternatif. La présence de l'exon change le cadre de lecture, ce qui modifie en partie la séquence d'acides aminés en aval de l'exon. Comme ce

nouvel exon se situe dans le domaine hémopexine, une protéine traduite à partir de ce transcrit aurait aussi une activité enzymatique différente de celle de la MMP-13 originale. Le dernier type de transcrit, COL3-ATS, diffère de la MMP-13 originale par la présence d'une plus longue région 5'-non traduite (environ 200 pb en amont du site de transcription habituel). La présence de ce type de transcrit suggère un site alternatif de transcription, donc, l'activité possible d'un promoteur alternatif.

Notre hypothèse suggère que les protéines dérivées de différents ARNs de la MMP-13 humaine auraient des rôles distincts à jouer dans la physiopathologie de l'OA. Ainsi, l'activité d'un transcrit pourrait être augmentée dans les tissus OA et, d'autre part, les différents ARNs seraient traduits en protéines présentant une activité enzymatique différente de celle de la MMP-13 originale et ainsi contribuer à une dégradation plus complète de la matrice. De plus, avec un lien plus direct avec notre étude, il sera intéressant d'envisager les différentes activités enzymatiques de ces isoformes sur les protéoglycanes, en particulier les SLRPs. D'ailleurs, l'isoforme COL3-DEL, privée de son domaine hémopexine, aurait une activité diminuée sur le collagène mais serait en revanche beaucoup plus active et moins spécifique. Ainsi elle pourrait avoir une activité plus importante sur les SLRPs. En effet, le domaine hémopexine confère la spécificité de substrat à la MMP-13. En le perdant, l'isoforme COL3-DEL acquiert une plus grande latitude de substrats, parmi lesquels les SLRPs seraient des candidats.

Cette étude constituait initialement le sujet de ce travail. La purification des différentes isoformes de la MMP-13 constitue un travail au long cours et deux des isoformes, COL3-9B-2 et COL3-DEL sont encore en voie de purification. Cependant, nous avons débuté par l'étude de la MMP-13 originale sur certains protéoglycanes et il nous est apparu important de bien définir l'activité de cette enzyme sur les SLRPs. Ceci a constitué mon projet de maîtrise et les résultats ont été rapportés dans ce mémoire.

**BIBLIOGRAPHIE**

- (1) Guccione AA, Felson DT, Anderson JJ, Anthony JM, Zhang Y, Wilson PW et al. The effects of specific medical conditions on the functional limitations of elders in the Framingham Study. *Am J Public Health* 1994; 84(3):351-358.
- (2) Dieppe PA, Lohmander LS. Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *Lancet* 2005; 365(9463):965-973.
- (3) Felson DT. Epidemiology of osteoarthritis. In *Osteoarthritis*. Edited by Brandt, Doherty, Lohmander. New York:Oxford University Press Inc.; 2003:9-21.
- (4) Xie F, Li SC, Thumboo J. Do Health-Related Quality-of-Life Domains and Items in Knee and Hip Osteoarthritis Vary in Importance Across Social-Cultural Contexts? A Qualitative Systematic Literature Review. *Semin Arthritis Rheum* 2005; 34(6):793-804.
- (5) Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43(9):1916-1926.
- (6) Martel-Pelletier J, Welsch DJ, Pelletier JP. Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001; 15(5):805-829.
- (7) Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum* 2001; 44(6):1237-1247.
- (8) Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fahmi H. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Semin Arthritis Rheum* 2003; 33(3):155-167.
- (9) Turner IH, Harle P, Muller-Ladner U, Gay RE, Gay S. The different stages of synovitis: acute vs chronic, early vs late and non-erosive vs erosive. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2005; 19(1):19-35.

- (10) Wilkinson LS, Pitsillides AA, Worrall JG, Edwards JC. Light microscopic characterization of the fibroblast-like synovial intimal cell (synoviocyte). *Arthritis Rheum* 1992; 35(10):1179-1184.
- (11) Edwards JC, Willoughby DA. Demonstration of bone marrow derived cells in synovial lining by means of giant intracellular granules as genetic markers. *Ann Rheum Dis* 1982; 41(2):177-182.
- (12) Athanasou NA. Synovial macrophages. *Ann Rheum Dis* 1995; 54(5):392-394.
- (13) Edwards JC. Fibroblast biology. Development and differentiation of synovial fibroblasts in arthritis. *Arthritis Res* 2000; 2(5):344-347.
- (14) Revell PA, al Saffar N, Fish S, Osei D. Extracellular matrix of the synovial intimal cell layer. *Ann Rheum Dis* 1995; 54(5):404-407.
- (15) Knorth H, Dorfmueller P, Lebert R, Schmidt WE, Wittenberg RH, Heukamp M et al. Participation of cyclooxygenase-1 in prostaglandin E2 release from synovitis tissue in primary osteoarthritis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12(8):658-666.
- (16) Saito I, Koshino T, Nakashima K, Uesugi M, Saito T. Increased cellular infiltrate in inflammatory synovia of osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10(2):156-162.
- (17) Konig A, Krenn V, Toksoy A, Gerhard N, Gillitzer R. Mig, GRO alpha and RANTES messenger RNA expression in lining layer, infiltrates and different leucocyte populations of synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis. *Virchows Arch* 2000; 436(5):449-458.
- (18) He W, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Laufer S, Di Battista JA. Synthesis of interleukin 1beta, tumor necrosis factor-alpha, and interstitial collagenase (MMP-1) is eicosanoid dependent in human osteoarthritis synovial

membrane explants: interactions with antiinflammatory cytokines. *J Rheumatol* 2002; 29(3):546-553.

- (19) Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 1971; 231(25):232-235.
- (20) Iniguez MA, Pablos JL, Carreira PE, Cabre F, Gomez-Reino JJ. Detection of COX-1 and COX-2 isoforms in synovial fluid cells from inflammatory joint diseases. *Br J Rheumatol* 1998; 37(7):773-778.
- (21) Boskey AL, Posner AS. Bone structure, composition, and mineralization. *Orthop Clin North Am* 1984; 15(4):597-612.
- (22) Roberts WE, Turley PK, Brezniak N, Fielder PJ. Implants: Bone physiology and metabolism. *CDA J* 1987; 15(10):54-61.
- (23) Lajeunesse D, Reboul P. Subchondral bone in osteoarthritis: a biologic link with articular cartilage leading to abnormal remodeling. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15(5):628-633.
- (24) Owen M. The origin of bone cells in the postnatal organism. *Arthritis Rheum* 1980; 23(10):1073-1080.
- (25) Knothe Tate ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(1):1-8.
- (26) Mackie EJ. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35(9):1301-1305.
- (27) Roodman GD, Ibbotson KJ, MacDonald BR, Kuehl TJ, Mundy GR. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 causes formation of multinucleated cells with several osteoclast characteristics in cultures of primate marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82(23):8213-8217.

- (28) Wiesmann HP, Meyer U, Plate U, Hohling HJ. Aspects of collagen mineralization in hard tissue formation. *Int Rev Cytol* 2005; 242:121-156.
- (29) Radin EL, Paul IL, Rose RM. Role of mechanical factors in pathogenesis of primary osteoarthritis. *Lancet* 1972; 1(7749):519-522.
- (30) Radin EL, Rose RM. Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clin Orthop Relat Res* 1986;(213):34-40.
- (31) Verstraeten A, Van Ermen H, Haghebaert G, Nijs J, Geusens P, Dequeker J. Osteoarthrosis retards the development of osteoporosis. Observation of the coexistence of osteoarthrosis and osteoporosis. *Clin Orthop Relat Res* 1991;(264):169-177.
- (32) Carlsson A, Nilsson BE, Westlin NE. Bone mass in primary coxarthrosis. *Acta Orthop Scand* 1979; 50(2):187-189.
- (33) Grynblas MD, Alpert B, Katz I, Lieberman I, Pritzker KP. Subchondral bone in osteoarthritis. *Calcif Tissue Int* 1991; 49(1):20-26.
- (34) Li B, Aspden RM. Mechanical and material properties of the subchondral bone plate from the femoral head of patients with osteoarthritis or osteoporosis. *Ann Rheum Dis* 1997; 56(4):247-254.
- (35) Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect* 1998; 47:477-486.
- (36) Pearle AD, Warren RF, Rodeo SA. Basic science of articular cartilage and osteoarthritis. *Clin Sports Med* 2005; 24(1):1-12.
- (37) Wong M, Carter DR. Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective. *Bone* 2003; 33(1):1-13.

- (38) Imhof H, Breienseher M, Kainberger F, Rand T, Trattnig S. Importance of subchondral bone to articular cartilage in health and disease. *Top Magn Reson Imaging* 1999; 10(3):180-192.
- (39) Maneiro E, Lopez-Armada MJ, de Andres MC, Carames B, Martin MA, Bonilla A et al. Effect of nitric oxide on mitochondrial respiratory activity of human articular chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 2005; 64(3):388-395.
- (40) Poole CA. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anat* 1997; 191 ( Pt 1):1-13.
- (41) Maneiro E, Martin MA, de Andres MC, Lopez-Armada MJ, Fernandez-Sueiro JL, Del Hoyo P et al. Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2003; 48(3):700-708.
- (42) Poole CA, Flint MH, Beaumont BW. Chondrons in cartilage: ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages. *J Orthop Res* 1987; 5(4):509-522.
- (43) Sipe JD. Acute-phase proteins in osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1995; 25(2):75-86.
- (44) Martel-Pelletier J. Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12 Suppl A:S31-S33.
- (45) Loeuille D, Olivier P, Watrin A, Grossin L, Gonord P, Guillot G et al. The biochemical content of articular cartilage: an original MRI approach. *Biorheology* 2002; 39(1-2):269-276.
- (46) Watanabe H. [Cartilage proteoglycan aggregate: structure and function]. *Clin Calcium* 2004; 14(7):9-14.
- (47) Maroudas A, Bayliss MT, Uchitel-Kaushansky N, Schneiderman R, Gilav E. Aggrecan turnover in human articular cartilage: use of aspartic acid

racemization as a marker of molecular age. *Arch Biochem Biophys* 1998; 350(1):61-71.

- (48) Maroudas A, Palla G, Gilav E. Racemization of aspartic acid in human articular cartilage. *Connect Tissue Res* 1992; 28(3):161-169.
- (49) van der RM, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J* 1991; 5(13):2814-2823.
- (50) Mendler M, Eich-Bender SG, Vaughan L, Winterhalter KH, Bruckner P. Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI. *J Cell Biol* 1989; 108(1):191-197.
- (51) Manek NJ, Spector TD. Evidence for the inheritance of osteoarthritis. In *Osteoarthritis*. Edited by Brandt, Doherty, Lohmander. New York:Oxford University Press Inc.; 2003:25-31.
- (52) Ruoslahti E. Structure and biology of proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol* 1988; 4:229-255.
- (53) Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 1998; 67:609-652.
- (54) Jackson RL, Busch SJ, Cardin AD. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol Rev* 1991; 71(2):481-539.
- (55) Mason RM, d'Arville C, Kimura JH, Hascall VC. Absence of covalently linked core protein from newly synthesized hyaluronate. *Biochem J* 1982; 207(3):445-457.
- (56) Kjellen L, Lindahl U. Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem* 1991; 60:443-475.

- (57) Turley EA. Proteoglycans and cell adhesion. Their putative role during tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev* 1984; 3(4):325-339.
- (58) Ruoslahti E. Proteoglycans in cell regulation. *J Biol Chem* 1989; 264(23):13369-13372.
- (59) Wight TN, Kinsella MG, Qwarnstrom EE. The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation. *Curr Opin Cell Biol* 1992; 4(5):793-801.
- (60) Lidholt K, Kjellen L, Lindahl U. Biosynthesis of heparin. Relationship between the polymerization and sulphation processes. *Biochem J* 1989; 261(3):999-1007.
- (61) Heinegard D, Oldberg A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J* 1989; 3(9):2042-2051.
- (62) Handley CJ, Lowther DA, McQuillan DJ. The structure and synthesis of proteoglycans of articular cartilage. *Cell Biol Int Rep* 1985; 9(9):753-782.
- (63) Doege KJ, Sasaki M, Kimura T, Yamada Y. Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. Human-specific repeats, and additional alternatively spliced forms. *J Biol Chem* 1991; 266(2):894-902.
- (64) Perkins SJ, Nealis AS, Dudhia J, Hardingham TE. Immunoglobulin fold and tandem repeat structures in proteoglycan N-terminal domains and link protein. *J Mol Biol* 1989; 206(4):737-753.
- (65) Halberg DF, Proulx G, Doege K, Yamada Y, Drickamer K. A segment of the cartilage proteoglycan core protein has lectin-like activity. *J Biol Chem* 1988; 263(19):9486-9490.
- (66) Neame PJ, Barry FP. The link proteins. *Experientia* 1993; 49(5):393-402.

- (67) Kallunki P, Tryggvason K. Human basement membrane heparan sulfate proteoglycan core protein: a 467-kD protein containing multiple domains resembling elements of the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules, and epidermal growth factor. *J Cell Biol* 1992; 116(2):559-571.
- (68) Noonan DM, Hassell JR. Perlecan, the large low-density proteoglycan of basement membranes: structure and variant forms. *Kidney Int* 1993; 43(1):53-60.
- (69) Iozzo RV, Cohen IR, Grassel S, Murdoch AD. The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices. *Biochem J* 1994; 302 ( Pt 3):625-639.
- (70) Klagsbrun M. The affinity of fibroblast growth factors (FGFs) for heparin; FGF-heparan sulfate interactions in cells and extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 1990; 2(5):857-863.
- (71) Yanagishita M, Hascall VC. Cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 1992; 267(14):9451-9454.
- (72) David G. Integral membrane heparan sulfate proteoglycans. *FASEB J* 1993; 7(11):1023-1030.
- (73) Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL et al. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol* 1992; 8:365-393.
- (74) Mali M, Jaakkola P, Arvilommi AM, Jalkanen M. Sequence of human syndecan indicates a novel gene family of integral membrane proteoglycans. *J Biol Chem* 1990; 265(12):6884-6889.
- (75) Elenius K, Salmivirta M, Inki P, Mali M, Jalkanen M. Binding of human syndecan to extracellular matrix proteins. *J Biol Chem* 1990; 265(29):17837-17843.

- (76) Sakaguchi K, Yanagishita M, Takeuchi Y, Aurbach GD. Identification of heparan sulfate proteoglycan as a high affinity receptor for acidic fibroblast growth factor (aFGF) in a parathyroid cell line. *J Biol Chem* 1991; 266(11):7270-7278.
- (77) Iozzo RV. The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins. *J Biol Chem* 1999; 274(27):18843-18846.
- (78) Hardingham TE, Fosang AJ. The structure of aggrecan and its turnover in cartilage. *J Rheumatol Suppl* 1995; 43:86-90.
- (79) Kresse H, Hausser H, Schonherr E. Small proteoglycans. *Experientia* 1993; 49(5):403-416.
- (80) Knudson CB, Knudson W. Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol* 2001; 12(2):69-78.
- (81) Scott JE. Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochem J* 1988; 252(2):313-323.
- (82) Schonherr E, Hausser H, Beavan L, Kresse H. Decorin-type I collagen interaction. Presence of separate core protein-binding domains. *J Biol Chem* 1995; 270(15):8877-8883.
- (83) Hedbom E, Heinegard D. Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar collagens. *J Biol Chem* 1993; 268(36):27307-27312.
- (84) Poole AR, Rosenberg LC, Reiner A, Ionescu M, Bogoch E, Roughley PJ. Contents and distributions of the proteoglycans decorin and biglycan in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *J Orthop Res* 1996; 14(5):681-689.
- (85) Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol* 1997; 136(3):729-743.

- (86) Wiberg C, Hedbom E, Khairullina A, Lamande SR, Oldberg A, Timpl R et al. Biglycan and decorin bind close to the n-terminal region of the collagen VI triple helix. *J Biol Chem* 2001; 276(22):18947-18952.
- (87) Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature* 1990; 346(6281):281-284.
- (88) Schmidt G, Hausser H, Kresse H. Interaction of the small proteoglycan decorin with fibronectin. Involvement of the sequence NKISK of the core protein. *Biochem J* 1991; 280 ( Pt 2):411-414.
- (89) Winnemoller M, Schmidt G, Kresse H. Influence of decorin on fibroblast adhesion to fibronectin. *Eur J Cell Biol* 1991; 54(1):10-17.
- (90) Winnemoller M, Schon P, Vischer P, Kresse H. Interactions between thrombospondin and the small proteoglycan decorin: interference with cell attachment. *Eur J Cell Biol* 1992; 59(1):47-55.
- (91) Bock HC, Michaeli P, Bode C, Schultz W, Kresse H, Herken R et al. The small proteoglycans decorin and biglycan in human articular cartilage of late-stage osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 9(7):654-663.
- (92) Scott JE, Haigh M. 'Small'-proteoglycan:collagen interactions: keratan sulphate proteoglycan associates with rabbit corneal collagen fibrils at the 'a' and 'c' bands. *Biosci Rep* 1985; 5(9):765-774.
- (93) Hedbom E, Heinegard D. Interaction of a 59-kDa connective tissue matrix protein with collagen I and collagen II. *J Biol Chem* 1989; 264(12):6898-6905.
- (94) Plaas AH, Neame PJ, Nivens CM, Reiss L. Identification of the keratan sulfate attachment sites on bovine fibromodulin. *J Biol Chem* 1990; 265(33):20634-20640.

- (95) Melching LI, Roughley PJ. The synthesis of dermatan sulphate proteoglycans by fetal and adult human articular cartilage. *Biochem J* 1989; 261(2):501-508.
- (96) Chakravarti S, Magnuson T, Lass JH, Jepsen KJ, LaMantia C, Carroll H. Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *J Cell Biol* 1998; 141(5):1277-1286.
- (97) Chakravarti S. Functions of lumican and fibromodulin: lessons from knockout mice. *Glycoconj J* 2002; 19(4-5):287-293.
- (98) Corpuz LM, Funderburgh JL, Funderburgh ML, Bottomley GS, Prakash S, Conrad GW. Molecular cloning and tissue distribution of keratocan. Bovine corneal keratan sulfate proteoglycan 37A. *J Biol Chem* 1996; 271(16):9759-9763.
- (99) Carlson EC, Liu CY, Chikama TI, Hayashi Y, Kao CW, Birk DE et al. Keratocan, a cornea-specific keratan sulfate proteoglycan, is regulated by lumican. *J Biol Chem* 2005.
- (100) Ramstad VE, Franzen A, Heinegard D, Wendel M, Reinholt FP. Ultrastructural distribution of osteoadherin in rat bone shows a pattern similar to that of bone sialoprotein. *Calcif Tissue Int* 2003; 72(1):57-64.
- (101) Sommarin Y, Heinegard D. Four classes of cell-associated proteoglycans in suspension cultures of articular-cartilage chondrocytes. *Biochem J* 1986; 233(3):809-818.
- (102) Bengtsson E, Morgelin M, Sasaki T, Timpl R, Heinegard D, Aspberg A. The leucine-rich repeat protein PRELP binds perlecan and collagens and may function as a basement membrane anchor. *J Biol Chem* 2002; 277(17):15061-15068.
- (103) Svensson L, Aszodi A, Reinholt FP, Fassler R, Heinegard D, Oldberg A. Fibromodulin-null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organization,

and altered lumican deposition in tendon. *J Biol Chem* 1999; 274(14):9636-9647.

- (104) Gill MR, Oldberg A, Reinholt FP. Fibromodulin-null murine knee joints display increased incidences of osteoarthritis and alterations in tissue biochemistry. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10(10):751-757.
- (105) Jepsen KJ, Wu F, Peragallo JH, Paul J, Roberts L, Ezura Y et al. A syndrome of joint laxity and impaired tendon integrity in lumican- and fibromodulin-deficient mice. *J Biol Chem* 2002; 277(38):35532-35540.
- (106) Melching LI, Roughley PJ. Modulation of keratan sulfate synthesis on lumican by the action of cytokines on human articular chondrocytes. *Matrix Biol* 1999; 18(4):381-390.
- (107) Shen Z, Gantcheva S, Sommarin Y, Heinegard D. Tissue distribution of a novel cell binding protein, osteoadherin, in the rat. *Matrix Biol* 1999; 18(6):533-542.
- (108) Schedel J, Wenglen C, Distler O, Muller-Ladner U, Scholmerich J, Heinegard D et al. Differential adherence of osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts to cartilage and bone matrix proteins and its implication for osteoarthritis pathogenesis. *Scand J Immunol* 2004; 60(5):514-523.
- (109) Johnson HJ, Rosenberg L, Choi HU, Garza S, Hook M, Neame PJ. Characterization of epiphycan, a small proteoglycan with a leucine-rich repeat core protein. *J Biol Chem* 1997; 272(30):18709-18717.
- (110) Funderburgh JL, Corpuz LM, Roth MR, Funderburgh ML, Tasheva ES, Conrad GW. Mimecan, the 25-kDa corneal keratan sulfate proteoglycan, is a product of the gene producing osteoglycin. *J Biol Chem* 1997; 272(44):28089-28095.

- (111) Iozzo RV. The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1997; 32(2):141-174.
- (112) Bentz H, Nathan RM, Rosen DM, Armstrong RM, Thompson AY, Segarini PR et al. Purification and characterization of a unique osteoinductive factor from bovine bone. *J Biol Chem* 1989; 264(34):20805-20810.
- (113) Madisen L, Neubauer M, Plowman G, Rosen D, Segarini P, Dasch J et al. Molecular cloning of a novel bone-forming compound: osteoinductive factor. *DNA Cell Biol* 1990; 9(5):303-309.
- (114) Reardon AJ, Le Goff M, Briggs MD, McLeod D, Sheehan JK, Thornton DJ et al. Identification in vitreous and molecular cloning of opticin, a novel member of the family of leucine-rich repeat proteins of the extracellular matrix. *J Biol Chem* 2000; 275(3):2123-2129.
- (115) Pellegrini B, Acland GM, Ray J. Cloning and characterization of opticin cDNA: evaluation as a candidate for canine oculo-skeletal dysplasia. *Gene* 2002; 282(1-2):121-131.
- (116) Friedman JS, Ducharme R, Raymond V, Walter MA. Isolation of a novel iris-specific and leucine-rich repeat protein (oculoglycan) using differential selection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(8):2059-2066.
- (117) Mansson B, Wenglen C, Morgelin M, Saxne T, Heinegard D. Association of chondroadherin with collagen type II. *J Biol Chem* 2001; 276(35):32883-32888.
- (118) Camper L, Heinegard D, Lundgren-Akerlund E. Integrin alpha2beta1 is a receptor for the cartilage matrix protein chondroadherin. *J Cell Biol* 1997; 138(5):1159-1167.

- (119) Shen Z, Gantcheva S, Mansson B, Heinegard D, Sommarin Y. Chondroadherin expression changes in skeletal development. *Biochem J* 1998; 330 ( Pt 1):549-557.
- (120) Tasheva ES, Ke A, Conrad GW. Analysis of the expression of chondroadherin in mouse ocular and non-ocular tissues. *Mol Vis* 2004; 10:544-554.
- (121) Tasheva ES, Ke A, Deng Y, Jun C, Takemoto LJ, Koester A et al. Differentially expressed genes in the lens of mimecan-null mice. *Mol Vis* 2004; 10:403-416.
- (122) Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991; 5(8):2145-2154.
- (123) Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997; 378(3-4):151-160.
- (124) Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *J Clin Invest* 1996; 97(9):2011-2019.
- (125) Pelletier JP. Rationale for the use of structure-modifying drugs and agents in the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12 Suppl A:S63-S68.
- (126) Freije JM, Diez-Itza I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tolivia J et al. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* 1994; 269(24):16766-16773.
- (127) Knauper V, Bailey L, Worley JR, Soloway P, Patterson ML, Murphy G. Cellular activation of proMMP-13 by MT1-MMP depends on the C-terminal domain of MMP-13. *FEBS Lett* 2002; 532(1-2):127-130.

- (128) Knauper V, Will H, Lopez-Otin C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H et al. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem* 1996; 271(29):17124-17131.
- (129) Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, Rosner PJ et al. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1996; 97(3):761-768.
- (130) Knauper V, Lopez-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 1996; 271(3):1544-1550.
- (131) Billingham RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C et al. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest* 1997; 99(7):1534-1545.
- (132) Knauper V, Cowell S, Smith B, Lopez-Otin C, O'Shea M, Morris H et al. The role of the C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction. *J Biol Chem* 1997; 272(12):7608-7616.
- (133) Fosang AJ, Last K, Knauper V, Murphy G, Neame PJ. Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13). *FEBS Lett* 1996; 380(1-2):17-20.
- (134) Stahle-Backdahl M, Sandstedt B, Bruce K, Lindahl A, Jimenez MG, Vega JA et al. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and in rheumatoid arthritis. *Lab Invest* 1997; 76(5):717-728.
- (135) Johansson N, Saarialho-Kere U, Airola K, Herva R, Nissinen L, Westermarck J et al. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes,

periosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development. *Dev Dyn* 1997; 208(3):387-397.

- (136) Tardif G, Reboul P, Depuis M, Geng C, Duval N, Pelletier JP, Martel-Pelletier J. Transforming growth factor-beta induced collagenase-3 production in human osteoarthritic chondrocytes is triggered by Smad proteins: cooperation between activator proteins and PEA-3 binding sites. *J Rheumatol* 2001; 28(7):1631-9.
- (137) Wernicke D, Seyfert C, Hinzmann B, Gromnica-Ihle E. Cloning of collagenase 3 from the synovial membrane and its expression in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Rheumatol* 1996; 23(4):590-595.
- (138) Uria JA, Balbin M, Lopez JM, Alvarez J, Vizoso F, Takigawa M et al. Collagenase-3 (MMP-13) expression in chondrosarcoma cells and its regulation by basic fibroblast growth factor. *Am J Pathol* 1998; 153(1):91-101.
- (139) Cazorla M, Hernandez L, Nadal A, Balbin M, Lopez JM, Vizoso F et al. Collagenase-3 expression is associated with advanced local invasion in human squamous cell carcinomas of the larynx. *J Pathol* 1998; 186(2):144-150.
- (140) Johansson N, Airola K, Grenman R, Kariniemi AL, Saarialho-Kere U, Kahari VM. Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Am J Pathol* 1997; 151(2):499-508.
- (141) Airola K, Johansson N, Kariniemi AL, Kahari VM, Saarialho-Kere UK. Human collagenase-3 is expressed in malignant squamous epithelium of the skin. *J Invest Dermatol* 1997; 109(2):225-231.
- (142) Johansson N, Vaalamo M, Grenman S, Hietanen S, Klemi P, Saarialho-Kere U et al. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by tumor cells in invasive vulvar squamous cell carcinomas. *Am J Pathol* 1999; 154(2):469-480.

- (143) Tardif G, Dupuis M, Reboul P, Geng CS, Pelletier JP, Ranger P et al. Identification and differential expression of human collagenase-3 mRNA species derived from internal deletion, alternative splicing, and different polyadenylation and transcription initiation sites. *Osteoarthritis Cartilage* 2003; 11(7):524-537.
- (144) Quinn CO, Scott DK, Brinckerhoff CE, Matrisian LM, Jeffrey JJ, Partridge NC. Rat collagenase. Cloning, amino acid sequence comparison, and parathyroid hormone regulation in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 1990; 265(36):22342-22347.
- (145) Caron JP, Tardif G, Martel-Pelletier J, DiBattista JA, Geng C, Pelletier JP. Modulation of matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3) gene expression in equine chondrocytes by interleukin 1 and corticosteroids. *Am J Vet Res* 1996; 57(11):1631-1634.
- (146) Vincenti MP, Coon CI, Mengshol JA, Yocum S, Mitchell P, Brinckerhoff CE. Cloning of the gene for interstitial collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) from rabbit synovial fibroblasts: differential expression with collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1). *Biochem J* 1998; 331 ( Pt 1):341-346.
- (147) Heathfield TF, Onnerfjord P, Dahlberg L, Heinegard D. Cleavage of fibromodulin in cartilage explants involves removal of the N-terminal tyrosine sulfate-rich region by proteolysis at a site that is sensitive to matrix metalloproteinase-13. *J Biol Chem* 2004; 279(8):6286-6295.
- (148) Imai K, Hiramatsu A, Fukushima D, Pierschbacher MD, Okada Y. Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. *Biochem J* 1997; 322 ( Pt 3):809-814.
- (149) Flannery CR, Lark MW, Sandy JD. Identification of a stromelysin cleavage site within the interglobular domain of human aggrecan. Evidence for

proteolysis at this site in vivo in human articular cartilage. *J Biol Chem* 1992; 267(2):1008-1014.

- (150) Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma HL et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* 2005; 434(7033):644-648.
- (151) Stanton H, Rogerson FM, East CJ, Golub SB, Lawlor KE, Meeker CT et al. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature* 2005; 434(7033):648-652.
- (152) Heinegard D, Bayliss, M. Lorenzo P. Pathogenesis of structural changes in the osteoarthritic joint. In *Osteoarthritis*. Edited by Brandt, Doherty, Lohmander. New York:Oxford University Press Inc.; 2003:73-92.
- (153) Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Altman RD, Ghandur-Mnaymneh L, Howell DS, Woessner JF, Jr. Collagenolytic activity and collagen matrix breakdown of the articular cartilage in the Pond-Nuki dog model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1983; 26(7):866-874.
- (154) Dodge GR, Poole AR. Immunohistochemical detection and immunochemical analysis of type II collagen degradation in human normal, rheumatoid, and osteoarthritic articular cartilages and in explants of bovine articular cartilage cultured with interleukin 1. *J Clin Invest* 1989; 83(2):647-661.
- (155) Hollander AP, Heathfield TF, Webber C, Iwata Y, Bourne R, Rorabeck C et al. Increased damage to type II collagen in osteoarthritic articular cartilage detected by a new immunoassay. *J Clin Invest* 1994; 93(4):1722-1732.
- (156) Hollander AP, Pidoux I, Reiner A, Rorabeck C, Bourne R, Poole AR. Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration. *J Clin Invest* 1995; 96(6):2859-2869.

- (157) Schmidt G, Hausser H, Kresse H. Extracellular accumulation of small dermatan sulphate proteoglycan II by interference with the secretion-recapture pathway. *Biochem J* 1990; 266(2):591-595.
- (158) Hausser H, Hoppe W, Rauch U, Kresse H. Endocytosis of a small dermatan sulphate proteoglycan. Identification of binding proteins. *Biochem J* 1989; 263(1):137-142.
- (159) Grover J, Chen XN, Korenberg JR, Roughley PJ. The human lumican gene. Organization, chromosomal location, and expression in articular cartilage. *J Biol Chem* 1995; 270(37):21942-21949.
- (160) Young AA, Smith MM, Smith SM, Cake MA, Ghosh P, Read RA et al. Regional assessment of articular cartilage gene expression and small proteoglycan metabolism in an animal model of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2005; 7(4):R852-R861.
- (161) Scott PG, McEwan PA, Dodd CM, Bergmann EM, Bishop PN, Bella J. Crystal structure of the dimeric protein core of decorin, the archetypal small leucine-rich repeat proteoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(44):15633-15638.
- (162) Yang VW, LaBrenz SR, Rosenberg LC, McQuillan D, Hook M. Decorin is a Zn<sup>2+</sup> metalloprotein. *J Biol Chem* 1999; 274(18):12454-12460.
- (163) Goldoni S, Owens RT, McQuillan DJ, Shriver Z, Sasisekharan R, Birk DE, Campbell S, Iozzo RV. Biologically active decorin is a monomer in solution. *J Biol Chem* 2004; 279 (8): 6606-6612.

## DÉCLARATION DE L'ÉTUDIANT CONCERNANT L'ARTICLE

Pour cet article, j'ai effectué toutes les manipulations, c'est-à-dire l'extraction des protéoglycanes du cartilage articulaire, les gels de séparation, la détection et toutes les expériences s'y rattachant (incubation avec l'inhibiteur et mise au point des temps de dégradation) sous la direction des Drs Johanne Martel-Pelletier et Jean-Pierre Pelletier. Le séquençage des protéines a été réalisé au Sheldom Company, Montréal, Qc, moyennant rétribution.

Jordi Monfort Faure, le 20 juillet 2005